

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Juliana Tonietto Domingues

**EFEITO DO T₃ REVERSO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDO PELO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO EM
HIPOCAMPO DE RATOS IMATUROS: ENVOLVIMENTO DE
MECANISMOS NÃO GENÔMICOS**

Florianópolis
2014

Juliana Tonietto Domingues

**EFEITO DO T₃ REVERSO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDO PELO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO EM
HIPOCAMPO DE RATOS IMATUROS: ENVOLVIMENTO DE
MECANISMOS NÃO GENÔMICOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Arianne Zamoner
Pacheco de Souza.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Domingues, Juliana Tonietto

Efeito do T3 reverso sobre o estresse oxidativo induzido pelo hipotireoidismo congênito em hipocampo de ratos imaturos: envolvimento de mecanismos não genômicos / Juliana Tonietto Domingues ; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza - Florianópolis, SC, 2014.

132 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Hipotireoidismo. 3. T3 reverso. 4. Sinalização Celular. 5. Estresse Oxidativo. I. Zamoner Pacheco de Souza, Ariane. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“Efeito do T3 reverso sobre o estresse oxidativo
induzido pelo hipotireoidismo congênito em hipocampo
de ratos imaturos: envolvimento de mecanismos não
genômicos”**

POR


Juliana Tonietto Domingues

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

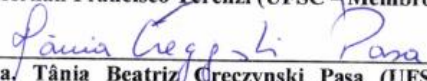
Banca Examinadora:




Prof.ª. Dra. Claudia Maria Oliveira Simões (UFSC – Membro
Titular)



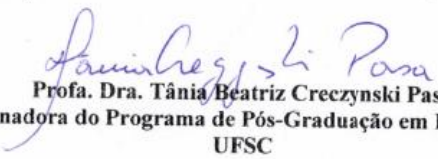
Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi (UFSC – Membro Titular)



Prof.ª. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Membro
Titular)



Prof.ª. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza (UFSC –
Orientadora)



Prof.ª. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 14 de fevereiro de 2014.

Dedico esta dissertação ao meu amado
e saudoso pai Josmar e a minha
querida mãe Beloni, pela vida e
formação que me deram.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Josmar e Beloni, pelo amor e carinho incondicionais, por todas as oportunidades a mim proporcionadas, e ao meu irmão Guilherme, que sempre me apoiou, me ouviu e me incentivou em todos os momentos da minha vida.

À minha querida amiga e orientadora Ariane Zamoner Pacheco de Souza pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a execução e conclusão desta dissertação, por toda a confiança, aprendizado e atenção dedicada a mim.

À professora Dr.^a Fátima Regina Mena Barreto da Silva pela colaboração no desenvolvimento desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular – LaBioSignal e aos colegas do laboratório de Hormônios e Transdução de Sinais, pelos momentos de trabalho e descontração, principalmente às minhas queridas amigas Bianka Almeida, Daiane Cattani, Patricia Cesconetto, Camila Mariana Andrade Renata Gonçalves, Carla Elise Heinz Rieg e Vera Lúcia de Liz Oliveira Cavalli, e pelo auxílio nos experimentos.

Aos meus queridos amigos Eduardo Benedetti Parisoto e Nádia Bucker, pelos momentos de descontração, pelas boas conversas que sempre alegraram e acalmaram meu coração.

As minhas amigas tão especiais Fernanda Tega e Daniele Palma pelo apoio constante e por estarem sempre presentes nos momentos mais importantes, as minhas queridas amigas Graziela Galvão, Mariana Remus e Daniela Moraes, por estarem sempre por perto, independente da distância e aos meus vizinhos Rodrigo Brito e Katia Gomes, por todo apoio e incentivo.

A todos aqui não mencionados e que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – PGFAR por ter oportunizado a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro.

“A arte de escutar é como uma luz que
dissipa a escuridão da ignorância.”
(Dalai Lama)

RESUMO

O hipotireoidismo congênito pode levar a uma grande diversidade de alterações neuroquímicas e morfofisiológicas que podem estar relacionadas a déficits de aprendizado, hipomielinização e falhas no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Neste trabalho foi investigado se o hormônio 3,3',5'-triiodotironina (T_3 reverso; T_{3r}) é capaz de reverter as alterações bioquímicas ocasionadas pelo hipotireoidismo congênito em fatias de hipocampo de ratos de 15 dias de idade, bem como o mecanismo de ação deste hormônio sobre este tecido. O hipotireoidismo congênito foi induzido em ratas Wistar prenhas com propiltiouracil (PTU) 0,05% na água de beber desde o 8º dia gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade, período no qual ocorre o pico da sinaptogênese em ratos. Os animais controles (eutireoideos) receberam apenas água durante o mesmo período. Fatias de hipocampo de ratos imaturos controles e hipotireoideos foram incubadas por 30 min com ou sem T_{3r} (10^{-9} M). Antagonistas de receptores (AP-5 e RGD), inibidores e ativadores das vias de sinalização da p38, CaMKII, ERK1/2, PKA e PKC (SB239063, KN-93, PD98059, H89 e PMA, respectivamente), bem como bloqueador de canal de cálcio dependente de voltagem do tipo-L (nifedipina) e quelante de cálcio intracelular (BAPTA-AM) foram utilizados para determinar os mecanismos envolvidos na ação não genômica do T_{3r} sobre células hipocâmpais. Também foram determinados marcadores bioquímicos (atividade das aminotransferases) e de dano oxidativo, assim como alterações na captação de $^{45}\text{Ca}^{++}$ e de [^{14}C]-2-desoxi-D-glicose em hipocampo de ratos imaturos tratados ou não com T_{3r} . O hipotireoidismo leva ao acúmulo de Ca^{++} intracelular e induz estresse oxidativo. Por outro lado, o T_{3r} , antes considerado um metabólito inativo dos hormônios da tireoide (HT), é capaz de reverter pelo menos algumas das alterações bioquímicas induzidas pelo hipotireoidismo congênito. Neste contexto, o T_{3r} interage com receptores de superfície do tipo integrina $\alpha_v\beta_3$ e ativa diversas rotas de transdução de sinal (PKA, CaMKII, ERK1/2 e p38). Estes eventos acarretam diminuição do influxo de $^{45}\text{Ca}^{++}$, estímulo na captação de [^{14}C]-2-desoxi-D-glicose, assim como revertem o estresse oxidativo induzido pelo hipotireoidismo congênito. Considerando-se que alterações nos níveis de HT estão relacionadas a doenças neurodegenerativas, depressão, ansiedade, entre outras, o entendimento dos mecanismos envolvidos na ação desses hormônios permitirá o desenvolvimento de fármacos mais específicos e

direcionados no controle de diversas doenças relacionadas ao SNC que possam estar associadas a disfunções tireoidianas.

Palavras chave: Hipotireoidismo congênito, T_3r , Estresse oxidativo, Mecanismo não genômico, Sinalização celular.

ABSTRACT

Congenital hypothyroidism can lead to a variety of neurochemical and morphophysiological alterations that may be associated with learning deficits, hypomyelination and delayed development of the central nervous system (CNS). In this study, it has been investigated whether the hormone 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T_3 , rT_3) is able to reverse the biochemical changes caused by congenital hypothyroidism in hippocampal slices from 15 day-old rats, as well as the mechanism of action of this hormone. Congenital hypothyroidism was induced by adding 0.05% propylthiouracil (PTU) in the drinking water from gestation day 8 and continually up to lactation day 15. Euthyroid rats, receiving only water during the same period, were used as controls. Control and hypothyroid pups were used at 15 day-old, considering the period of maximum synaptogenesis. Hippocampal slices from controls and hypothyroid pups were incubated for 30 min with or without rT_3 (10^{-9} M). Receptor antagonists (RGD and AP-5), inhibitors or activators of cell signaling pathways of p38, CaMKII, ERK1/2, PKA and PKC (SB239063, KN-93, PD98059, H89 and PMA, respectively), as well as L-type voltage-dependent calcium channel blocker (nifedipine) and intracellular calcium chelator (BAPTA -AM), were used to determine the mechanisms involved in the nongenomic action of rT_3 on hippocampal cells. We also analyzed some biochemical markers (aminotransferase activity) and oxidative stress parameters, as well as changes in the uptake of $^{45}\text{Ca}^{++}$ and [^{14}C]-2-deoxy-D-glucose in the hippocampus of immature rats treated or not with rT_3 . Results showed that hypothyroidism leads to accumulation of intracellular Ca^{++} and induces oxidative stress. On the other hand, rT_3 , previously considered as an inactive metabolite of thyroid hormones (TH), was able to reverse, at least some of the biochemical changes induced by congenital hypothyroidism. In this context, rT_3 interacts with the surface $\alpha_v\beta_3$ integrin receptors activating several signal transduction pathways (PKA, CaMKII, ERK1/2 and p38). These events cause a decrease in $^{45}\text{Ca}^{++}$ influx, stimulation in [^{14}C]-2-deoxy-D-glucose uptake, as well as reverse the oxidative stress induced by congenital hypothyroidism. Considering that changes in TH levels could be associated with neurodegenerative disorders, depression, anxiety, among others, the understanding of mechanisms of action of these hormones might allow the development of more specific and targeted drugs in controlling several physiopathological disorders of CNS.

Keywords: Congenital hypothyroidism, rT_3 , Oxidative stress, Nongenomic mechanism, Cell signaling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.....	31
Figura 2 - Desiodação enzimática dos hormônios da tireoide pelas desiodases.....	33
Figura 3 - Mecanismo clássico de ação dos hormônios da tireoide .	35
Figura 4- Representação esquemática de ações não-genômicas dos HT.....	38
Figura 5 - Representação da estrutura hipocampal de humanos	45
Figura 6- Representação esquemática ilustrando as subregiões do hipocampo dorsal no plano coronal do cérebro de rato.....	46
Figura 7 - Sistema de neurotransmissão glutamatérgica	48
Figura 8. - Destino metabólico do glutamato captado pelos astrócitos	51
Figura 9 - Ciclo Glutamato-Glutamina.....	52
Figura 10- Interação metabólica entre astrócitos e neurônios na modulação do metabolismo da GSH.....	60
Figura 11- Biossíntese da GSH	61
Figura 12.- Possíveis alvos do T ₃ r em hipocampo de ratos hipotireoideos imaturos	65
Figura 13 - Efeito do T ₃ r sobre a captação de ⁴⁵ Ca ⁺⁺ em hipocampo de ratos imaturos.	78
Figura 14 -Efeito do hipotireoidismo e do T ₃ r sobre os níveis de GSH em hipocampo de ratos imaturos.	79
Figura 15 - Efeito do hipotireoidismo congênito e do T ₃ r sobre a peroxidação lipídica em hipocampo de ratos imaturos.	79
Figura 16 - Efeito do T ₃ r e do hipotireoidismo congênito sobre a carbonilação de proteínas.	80
Figura 17- Efeito do hipotireoidismo congênito e do T ₃ r sobre a atividade da G6PD (A) e da GR (B) em hipocampo de ratos imaturos.....	81

Figura 18 - Efeito do hipotireoidismo congênito e do T ₃ r sobre a atividade da GPx em hipocampo de ratos imaturos.....	82
Figura 19- Efeito do hipotireoidismo congênito e do T ₃ r sobre a atividade da catalase em hipocampo de ratos imaturos.	82
Figura 20 - Efeito do hipotireoidismo congênito e do T ₃ r sobre a atividade da SOD em hipocampo de ratos imaturos.....	83
Figura 21- Efeito do hipotireoidismo congênito e do T ₃ r sobre a atividade da gama-glutamil transferase em hipocampo de ratos imaturos.	84
Figura 22- Envolvimento dos receptores de membrana do tipo NMDA e da integrina $\alpha v\beta 3$ no mecanismo de ação do T ₃ r sobre a atividade da GGT em hipocampo de ratos imaturos.....	85
Figura 23- Envolvimento do cálcio e da PKC no mecanismo de ação do T ₃ r sobre a atividade da GGT em hipocampo de ratos imaturos.	86
Figura 24- Participação de proteínas cinases no mecanismo de ação do T ₃ r sobre a atividade da GGT em hipocampo de ratos imaturos.	87
Figura 25- Efeito do T ₃ r sobre a captação de ¹⁴ C-2-desoxi-D-glicose no hipocampo de animais hipotireoideos.	88
Figura 26- Efeito dos HT T ₃ ,T ₄ e T ₃ r sobre a atividade das enzimas AST (A) e ALT (B).	89
Figura 27- Mecanismo de ação proposto para o T ₃ r em hipocampo de ratos imaturos submetido ao modelo de hipotireoidismo congênito	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis séricos dos hormônios da tireoide e do TSH em soro de ratos imaturos de 15 dias de idade.	68
Tabela 2 - Compostos utilizados para estudar o mecanismo de ação do T ₃ r sobre as células hipocâmpais.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ABP	Proteína de ligação a actina
ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHE	Barreira hematoencefálica
^{14}C -DG	^{14}C -2-desoxi-D-glicose
Ca^{++}	Cálcio
CaMKII	Proteína cinase dependente de Ca^{++} /Calmodulina II
CAT	Catalase
CCDV	Canal de cálcio dependente de voltagem
DAG	Diacilglicerol
DG	Giro dentiado
D1	Desiodase tipo 1
D2	Desiodase tipo 2
D3	Desiodase tipo 3
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas do oxigênio
F-actina	Filamentos de actina
GABA	Ácido γ -aminobutírico
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GGT	Gama-glutamyltransferase
GLAST	Transportador glutamato/aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato-1
GLUR	Receptor de glutamato
GLUT	Transportador de glicose
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GS	Glutamina sintetase

GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
HOCl	Ácido hipocloroso
HT	Hormônios tireoidianos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IP3	1,4,5-trifosfato de inositol
JNK 1/2	Cinase c-Jun N-terminal
KA	Receptor para cainato
LDH	Lactato desidrogenase
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAPK	Proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno
MCT8	Transportadores de monocarboxilato 8
MDA	Malondialdeído
MeAIB	Ácido α -(metil-amino)-isobutírico
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida
NMDA	N-metil-D-aspartato
N ₂ O ₃	Ácido nitroso
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
•NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{-•}	Radical ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
•OH	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PC	Piruvato carboxilase
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
PMA	Acetato de forbol-miristoil
PTU	6-propil-2-tiuracil
RGD	Arginina-Glicina-Aspartato
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RO•	Radical alcóxil
ROO•	Radical peróxil
RXR	Receptor retinoide X

SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SOD-CuZn	Superóxido dismutase-cobre-zinco
SOD-Mn	Superóxido dismutase-mangânes
SOD-EC	Superóxido dismutase-extracelular
T ₃	Triiodotironina; 3,3',5-triiodo-L-tironina
T ₃ r	3,3',5'-triiodo-L-tironina; T ₃ reverso
T ₄	Tiroxina; 3,3',5,5'-tetraiodotironina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácidos tricarboxílicos
TETRAC	Ácido tetraiodotiroacético
TR	Receptor para hormônios tireoidianos
TR α	Receptor nuclear dos hormônios tireoideos tipo α
TR β	Receptor nuclear dos hormônios tireoideos tipo β
TRH	Hormônio de liberação da tireotrofina
TREs	Elemento de resposta aos hormônios tireoidianos
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
VGLUT	Transportador de glutamato vesicular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	OBJETIVOS.....	29
1.1.1	Objetivo Geral.....	29
1.1.2	Objetivos Específicos.....	29
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	31
2.1	HORMÔNIOS TIREOIDIANOS.....	31
2.1.1	Mecanismos moleculares de ação hormonal	34
2.2	VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR.....	39
2.3	HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO.....	42
2.4	SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	44
2.5	HIPOCAMPO.....	45
2.6	GLUTAMATO.....	47
2.6.1	Receptores Glutamatérgicos.....	48
2.6.2	Metabolismo do Glutamato.....	49
2.6.3	Ciclo Glutamato-Glutamina.....	51
2.6.4	Excitotoxicidade Glutamatérgica.....	53
2.7	ESTRESSE OXIDATIVO.....	53
2.7.1	Espécies Reativas de Oxigênio.....	53
2.7.2	Peroxidação Lipídica.....	56
2.7.3	Sistema de Defesa Antioxidante.....	56
2.7.4	Antioxidantes Enzimáticos.....	57
2.7.5	Antioxidantes Não Enzimáticos.....	60
2.7.6	Estresse Oxidativo e Hormônios da Tireoide.....	62
3	HIPÓTESE.....	65
4	METODOLOGIA.....	67
4.1	MATERIAIS.....	67
4.2	MÉTODOS.....	67
4.2.1	Tratamento dos animais.....	67
4.2.2	Captação de Cálcio.....	70
4.2.3	Conteúdo de GSH.....	71
4.2.4	Determinação dos marcadores de dano oxidativo.....	71
4.2.5	Atividade enzimática.....	72
4.2.6	Captação de glicose.....	74
4.2.7	Concentração de proteínas.....	75
4.2.8	Análise estatística.....	75
5	RESULTADOS.....	77
5.1	CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{++}$	77
5.2	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NO	78

	ESTRESSE OXIDATIVO.....	
5.3	MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO DO T ₃ r SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GGT.....	84
5.4	CAPTAÇÃO DE GLICOSE.....	88
5.5	EFEITO DO HIPOTIREOIDISMO E DO T ₃ r SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS AST/ALT.....	89
6	DISCUSSÃO.....	91
6.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
7	CONCLUSÕES.....	103
8	PERSPECTIVAS.....	105
	REFERÊNCIAS.....	107

1. INTRODUÇÃO

Os hormônios da tireoide (HT), 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T₃) e tiroxina (T₄), são importantes reguladores metabólicos e fisiológicos de diversos tecidos tanto durante a fase imatura quanto adulta, sendo cruciais para o desenvolvimento e função neurais (BERNAL, 2002). Nos últimos anos, o 3,3',5'-triiodo-L-tironina (T₃ reverso; T_{3r}), antes considerado a forma inativa dos HT, vem sendo amplamente estudado em diferentes tipos celulares (FARWELL *et al.*, 2005; ZANATTA *et al.*, 2013).

No sistema nervoso central (SNC), os HT são fundamentais nos processos de mielinização (FERNÁNDEZ *et al.*, 2009), neuritogênese (MARTINEZ; GOMES 2002), maturação dos sistemas de neurotransmissores (BAUER ; WHYBROW 2001), plasticidade sináptica (FERNÁNDEZ-LAMO *et al.*, 2009; VALLORTIGARA *et al.*, 2008; VALLORTIGARA *et al.*, 2009), fosforilação dos filamentos intermediários (ZAMONER *et al.*, 2007a, 2008a,b), assim como regulação de genes implicados em transtornos psiquiátricos (SUI *et al.*, 2010). Neste contexto, tanto o hiper quanto o hipotireoidismo podem afetar a maturação do SNC e causar disfunções irreversíveis no cérebro tanto de roedores quanto de humanos (WONG; LEUNG, 2001).

O hipotireoidismo pode reduzir a capacidade de produzir “potenciação” de longa duração (LTP – *long-term potentiation*), comprometendo os processos de memória e aprendizado tanto em humanos quanto em ratos. Alva-Sanchez *et al.* (2009) demonstraram que os danos neuronais ao hipocampo de ratos hipotireoideos requerem ativação de receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Além disso, Giné e colegas (2010) recentemente demonstraram que ratos com hipotireoidismo são extremamente vulneráveis aos efeitos neurotóxicos pró-convulsivantes do cainato. Estes eventos podem estar relacionados com o fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica, corroborando resultados de nosso grupo de pesquisa demonstrando que o hipotireoidismo diminui a captação de glutamato, aumenta o influxo de Ca⁺⁺ e induz estresse oxidativo em hipocampo de ratos hipotireoideos (CATTANI *et al.*, 2013).

Diversos estudos apontam para o envolvimento dos HT com os sistemas de defesa antioxidante. Neste contexto, tem sido descrito que o

tratamento com T_3 ou T_4 pode reverter o estresse oxidativo induzido pelo hipotireoidismo em diferentes tipo celulares de ratos adultos (Das *et al.*, 2001; Dasgupta *et al.*, 2005, Pan *et al.*, 2012). Por outro lado, os hormônios T_3 e T_4 não foram capazes de reverter a hiperfosforilação dos neurofilamentos causada pelo hipotireoidismo congênito (ZAMONER *et al.*, 2008b). Surpreendentemente, os hormônios T_{3r} e T_4 , mas não o T_3 , foram capazes de restaurar os níveis de actina filamentosa (F-actina) em células cerebelares de ratos hipotireoideos neonatos (FAVIRE-SARRAIHL; RABIE, 1988; FARWELL *et al.*, 2006; LEONARD, 2008). Estes dados corroboram o T_{3r} como uma forma biologicamente ativa dos HT, e não apenas um metabólito inativo. Analisando estes dados em conjunto, sugere-se que os HT desempenham funções diferentes dependendo do hormônio (T_3 , T_4 ou T_{3r}), do estágio de desenvolvimento e/ou do tipo celular.

Os HT podem atuar no cérebro através de mecanismos de sinalização genômicos ou não genômicos. Neste sentido, o dímero de integrina $\alpha\beta 3$ tem sido sugerido como um provável receptor de membrana para os HT, tendo maior afinidade para o T_4 e o T_{3r} do que para o T_3 (PLOW, *et al.*, 2000, BERGH *et al.*, 2005), enquanto o receptor nuclear para os HT interage com T_3 , mas é pouco responsivo aos demais HT (DAVIS; LEONARD; DAVIS, 2008).

Considerando o que foi exposto, este estudo pretende investigar o potencial efeito neuroprotetor do T_{3r} frente ao estresse oxidativo induzido pelo hipotireoidismo congênito em hipocampo de ratos hipotireoideos, bem como desvendar as vias de sinalização celular envolvidas neste processo.

O conhecimento das bases moleculares de ação hormonal permitirá o desenvolvimento de fármacos mais específicos e direcionados no controle de neoplasias e diversas outras doenças relacionadas ao SNC que possam estar associadas a disfunções tireoidianas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar as alterações bioquímicas em modelo animal de hipotireoidismo congênito após exposição “*in vitro*” aos HT, com ênfase no estudo dos mecanismos de neurotoxicidade e neuroproteção do hormônio T_3 reverso.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Estudar o efeito do hipotireoidismo congênito sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo em hipocampo de ratos;
- ✓ Determinar as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) e substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo de ratos submetidos ao modelo experimental de hipotireoidismo antes e após suplementação *in vitro* com T_3 ;
- ✓ Verificar o efeito do hipotireoidismo congênito sobre a atividade da gama-glutamil transferase (GGT) em córtex cerebral e hipocampo de ratos imaturos;
- ✓ Estudar o efeito do T_3 sobre a atividade das enzimas antioxidantes (GGT, glicose-6-fosfato desidrogenase - G6PD, glutathiona redutase - GR, glutathiona peroxidase - GPx, catalase - CAT e superóxido dismutase - SOD) em fatias de hipocampo de animais controles e hipotireoideos;
- ✓ Estudar os mecanismos de sinalização celular envolvidos na modulação da atividade GGT pelo T_3 sobre hipocampo de ratos hipotireoideos.

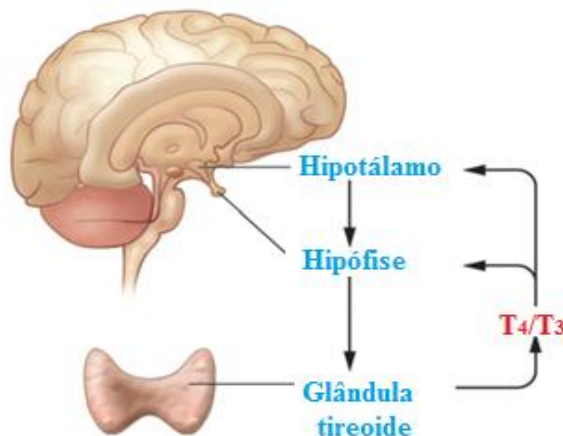
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

Os HT são sintetizados pela glândula tireoide, que é constituída de folículos. A luz desses folículos é repleta de um coloide espesso que contém a tireoglobulina, uma glicoproteína que contém cerca de 115 resíduos de tirosina. A iodação desses resíduos é capaz de produzir os HT. Os principais HT são o T_4 , o T_3 e o T_{3r} (KÖHRLE; 1999; BRENT 2012).

A síntese e a liberação dos HT são reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, de maneira que o hormônio de liberação da tireotrofina (TRH), liberado pelo hipotálamo em resposta a diversos estímulos, induz a liberação do hormônio estimulante da tireoide (TSH; tireotrofina) pela hipófise anterior. O TSH atua em receptores de membrana das células foliculares, estimulando a síntese e a liberação dos HT. Os níveis de TRH e TSH são controlados por um sistema de retroalimentação negativa, no qual as concentrações plasmáticas dos HT modulam negativamente a liberação hormonal, tanto no hipotálamo como na hipófise (BOELAERT; FRANKLYN, 2005; BRENT, 2012). Os mecanismos de regulação da atividade da tireoide, que envolvem o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, estão representados na figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.



Fonte: Adaptado de Brent (2012).

O principal hormônio sintetizado e secretado pela glândula tireoide é o T_4 , o qual é transportado e distribuído no espaço extratireoidal e na circulação periférica através de sua associação com proteínas de ligação. A globulina de ligação de tiroxina é a proteína mais importante, sendo que a transtirretina e a albumina também desempenham um papel no transporte do T_4 na circulação (KÖHRLE, 1999). Assim, este hormônio é amplamente distribuído nos tecidos periféricos, onde pode ser convertido por desiodação a T_3 , hormônio considerado biologicamente ativo sobre a modulação da transcrição gênica, ou metabolizado a T_{3r} , sendo esta iodotironina descrita como a mais abundante durante o período fetal (CHOPRA; SACK; FISHER, 1975; ROTI, 1982; FARWELL *et al.*, 2005). Tanto T_4 quanto T_{3r} são considerados inativos em relação à modulação direta da função do receptor nuclear para T_3 (KÖHRLE, 1999).

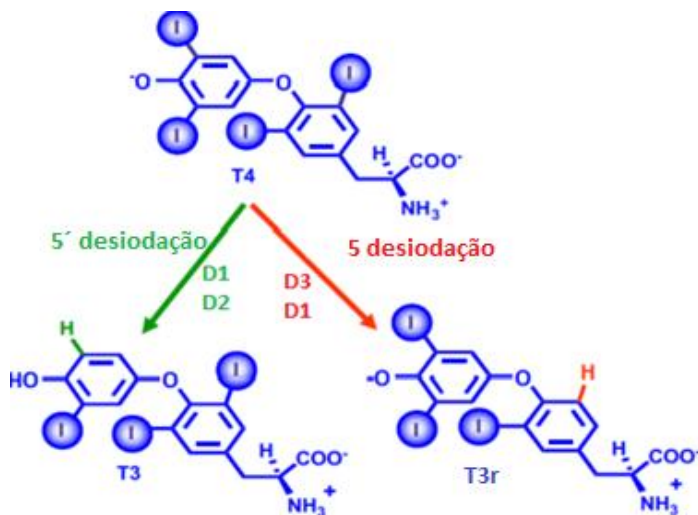
A desiodação dos HT é catalisada pelas desiodases teciduais que são expressas em 3 isoformas (D1, D2, D3). Estas isoenzimas apresentam diferentes padrões de expressão durante o desenvolvimento sendo específicas para cada tecido (BOELAERT; FRANKLYN, 2005). A desiodação de T_4 a T_3 , ou a T_{3r} , está representada esquematicamente na figura 2.

A D1 é capaz de desiodar os anéis tirosínico (interno) e fenólico (externo) do hormônio; então, esta isoenzima pode converter T_4 em T_3 ou T_{3r} , assim como produzir 3,3'- T_2 a partir do T_3 ou T_{3r} (GEREBEN *et al.*, 2008). A D1 é encontrada principalmente no fígado, no rim e na glândula tireoide. Esta desiodase é responsável por produzir no fígado cerca 70% do T_3 circulante em condições metabólicas normais. Sua expressão é induzida pelos HT e pelo ácido retinoico. O hipotireoidismo é caracterizado por diminuir a expressão da D1 nestes tecidos (KÖHRLE, 1999).

Similar à ação da D1, a D2 também catalisa a produção de T_3 através da desiodação do T_4 , agindo diretamente no anel fenólico. Sua atividade é regulada pelo mecanismo ubiquitinase/desubiquitinase. A desiodação de T_4 pela D2 resulta na exposição de resíduos de lisina, e a ubiquitinação desses resíduos reduz a atividade da D2, enquanto a desubiquitinação aumenta sua atividade (SAGAR *et al.* 2007, 2008; BRENT, 2012). Sagar e colaboradores (2007) demonstraram que uma vez ligada ao T_4 , seu substrato natural, a D2 é ubiquitinada, o que resulta na inativação da enzima devido à interferência com a superfície globular de interação da D2, que é crítica para sua dimerização e atividade catalítica. Assim, uma vez aumentados os níveis de T_4 a D2 é

rapidamente inativada. Esta desidase é expressa na glândula pituitária, cérebro, tecido adiposo marrom, gônadas, glândula pineal, timo de ratos, e glândula mamária de camundongos (GEREBEN *et al.*, 2008).

Figura 2 - Desiodação enzimática dos hormônios da tireoide pelas desidases



A metabolização do hormônio T₄ para T₃ é catalisada por D1 e D2 (vermelho). A metabolização de T₄ a T_{3r} ocorre por D1 e D3 (verde).

Fonte: Adaptado de Kohrle (2007).

No cérebro, a desiodação pela D2 é responsável por produzir aproximadamente 70-80% do total de T₃ neste tecido (BERNAL, 2005). O RNAm da D2 é localizado nos astrócitos em várias regiões cerebrais. A expressão deste RNAm na glia sugere que essas células captam o T₄ da circulação e o convertem a T₃ por ação da D2. A atividade enzimática e a concentração do RNAm para D2 estão elevadas em situações de diminuição do T₄, aumentando a produção de T₃ desempenhando um importante efeito neuroprotetor contra o hipotireoidismo (GUADAÑO-FERRAZ *et al.*, 1999). Os níveis hormonais também podem modular a atividade da D3 cerebral, que catalisa a inativação de T₃. Esta desidase remove o iodo somente do anel tirosínico, portanto, já foi considerada uma enzima inativadora dos HT e análogos (KÖHRLE, 1999).

A D3 é uma proteína de membrana que contém um único domínio transmembrana entre os resíduos 16 e 41 (BAQUI *et al.*, 2003). Esta localização favorece a função da D3 na placenta, útero e fígado fetal, limitando a passagem dos HT maternos para o feto (GEREBEN *et al.*, 2008). A ação determinante da D3 no cérebro catalisa a formação dos metabólitos T_{3r} a partir do T_4 e de T_2 a partir de T_3 . O T_{3r} foi considerado durante muito tempo como um metabólito inativo do T_4 , mas hoje já são conhecidas várias ações deste hormônio, que atua provavelmente através da interação com receptores de membrana para os HT (FARWELL; DUBORD-TOMASETTI, 1999; FARWELL *et al.*, 2005; ZANATTA *et al.*, 2013). Acredita-se que a D3 tem um papel importante impedindo a exposição excessiva ao T_3 . A D3 no cérebro é expressa nos neurônios, e durante o desenvolvimento perinatal esta desidrase pode restringir a quantidade de T_3 a partir da circulação, de modo que a maior parte do T_3 que age no cérebro durante a vida fetal e início da pós-natal seria derivada do T_4 presente nos astrócitos (HERNANDEZ *et al.*, 2012).

A regulação coordenada das atividades das desidrases cerebrais D2 e D3 parece ser importante para manter a homeostasia das iodotironinas neste tecido (DARRAS; HUMER; VISSER, 1999).

2.1.1 Mecanismos moleculares de ação hormonal

2.1.1.1 Mecanismo clássico, genômico de ação dos hormônios tireoidianos

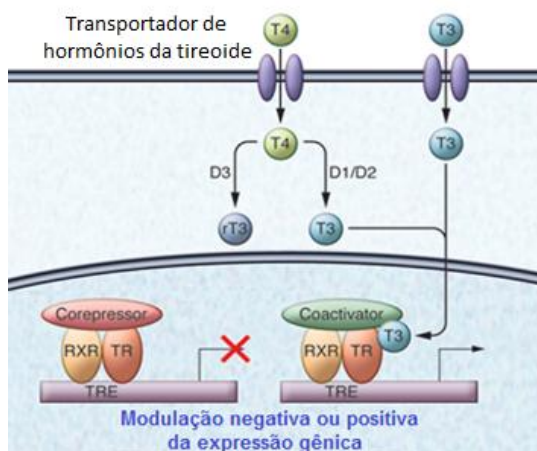
Em conjunto, os HT exercem uma série de efeitos dependentes ou independentes da interação com os receptores nucleares para os hormônios tireoidianos (TRs), sendo importantes reguladores metabólicos e fisiológicos de inúmeros tecidos, tanto durante a fase imatura, quanto na fase adulta. Assim, os HT são essenciais para o desenvolvimento e funções neurais (ANDERSON, 2001; BERNAL; GUDANO-FERRAZ; MORTE, 2003, ZAMONER *et al.*, 2006a, 2007a; CATTANI *et al.*, 2013); bem como para as funções do sistema pulmonar, sistema cardiovascular (PATRICK, 2009), sistema reprodutor (HOLSBERGER; COOKE, 2005; SILVA *et al.*, 2001; ZAMONER *et al.*, 2005, 2006a, ZAMONER; PESSOA-PEREUR; SILVA, 2011; ZANATTA *et al.*, 2013), entre outros.

Os HT são transportados para o interior das células-alvo principalmente através de transportadores de monocarboxilato 8

(MCT8) (BRENT, 2012). Uma vez captados pelas células, os HT podem sofrer desiodação, sendo que o T_3 poderá ser translocado para o núcleo da célula. As ações do T_3 são iniciadas pela sua interação com os TRs. Quatro importantes isoformas dos TRs foram bem caracterizadas em seres humanos ($TR\alpha 1$, $TR\alpha 2$, $TR\beta 1$ e $TR\beta 2$) (WILLIAMS, 2000).

O mecanismo clássico de ação dos HT envolve a formação do complexo TR- T_3 , o qual se liga na forma de homo ou heterodímero em regiões específicas do DNA, conhecidas como elementos de resposta dos hormônios da tireoide (TREs), que estão localizadas na região promotora dos genes alvo. A interação do T_3 com o TR favorece a formação de heterodímeros com o receptor retinoide X (RXR). Durante esse processo, proteínas conhecidas como co-repressoras ou co-ativadoras são recrutadas na região promotora do gene alvo. Este mecanismo leva a uma modificação na cromatina e na regulação da transcrição gênica (BASSETT; HARVEY; WILLIAMS, 2003; BOELAERT ; FRANKLYN, 2005). O hormônio T_4 também pode atuar através dos receptores nucleares; entretanto, a afinidade de ligação destes receptores ao T_3 é bem maior do que ao T_4 . Assim, o T_3 é o ligante natural dos TRs (DAVIS; LEONARD; DAVIS, 2008). O mecanismo clássico de ação dos HT está representado na figura 3.

Figura 3 - Mecanismo clássico de ação dos hormônios da tireoide



Os transportadores MCT8 transportam T_4 e T_3 para o interior da célula, onde estes podem ser desiodados. O T_3 interage com o TR, favorecendo a formação

de heterodímeros com o receptor RXR, que interagem com os TRE, acarretando na modulação da expressão gênica.

Fonte: Adaptado de Brent (2012).

2.1.1.2 Ações não genômicas dos hormônios tireoidianos

A noção de ações não genômicas, independentes dos receptores nucleares, tem evoluído desde a hipótese de trabalhos pioneiros sugerindo que os HT poderiam causar um estímulo rápido na captação de Ca^{++} , o qual seria independente da síntese proteica, envolvendo assim ativação da fosfolipase C (PLC), com liberação de trifosfato de inositol (IP_3), e consequente ativação da proteína cinase C (PKC) (SEGAL; INGBAR, 1989). Além disso, Zamoner e colaboradores (2007a) descreveram que o T_3 e o T_4 aumentam o influxo de Ca^{++} no córtex cerebral de ratos em desenvolvimento expostos a estes hormônios, levando à uma oscilação intracelular deste íon através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) do tipo L e T. Além disso, o T_4 desencadeia esses efeitos em concentrações fisiológicas, enquanto o T_3 produz um efeito similar em concentrações suprafisiológicas, mostrando um papel preferencial para o T_4 nesta ação não genômica. A identificação do Ca^{++} como primeiro mensageiro para a ação do T_3 na membrana plasmática enfatiza a captação de Ca^{++} como um evento pioneiro após a ligação do hormônio com o respectivo receptor de membrana (ZAMONER *et al.*, 2007a; 2008b).

O mecanismo não genômico de ação dos HT pode também conectar-se a eventos de transdução nuclear, através da ativação de uma ou mais vias de sinalização (DAVIS; DAVIS; CODY, 2005; ZAMONER; PESSOA-PUREUR, 2011). Dessa forma, a sinalização hormonal não genômica também pode resultar em efeitos dependentes de DNA, como por exemplo, o aumento da proliferação de células gliais (DAVIS *et al.*, 2006; ZAMONER *et al.*, 2007b).

A existência de sítios de ligação na membrana celular para os HT já é conhecida há muito tempo na membrana de células vermelhas do sangue (SCHWARTZ *et al.*, 1967). Plow e colaboradores (2000) descreveram um receptor de membrana para HT como um heterodímero de integrina $\alpha\text{v}\beta 3$, que está localizado na região de reconhecimento Arg-Gly-Asp (RGD), um sítio na integrina responsável pela ligação a uma série de proteínas de matrix extracelular. Em 2005, Bergh e colaboradores demonstraram que a integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ está acoplada à via de

sinalização de proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e por eventos intracelulares mediados por esta via de transdução de sinal, incluindo a modulação da transcrição gênica. A ativação da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) pela integrina de membrana $\alpha\beta3$ culmina também em ações locais de membrana como no sistema de transporte de íons, tais como a modulação do trocador H^+/Na^+ , afetando a concentração intracelular de Na^+ e o pH intracelular (D'AREZZO *et al.*, 2004). Sabe-se que um grande número de mecanismos celulares não genômicos estão envolvidos no sistema de transporte de íons, entre estes Na^+ , K^+ e Ca^{++} , e estes efeitos parecem ser relevantes para a função neural (DAVIS *et al.*, 2010; ZAMONER *et al.*, 2007a; ZAMONER; PESSOA-PUREUR, 2011).

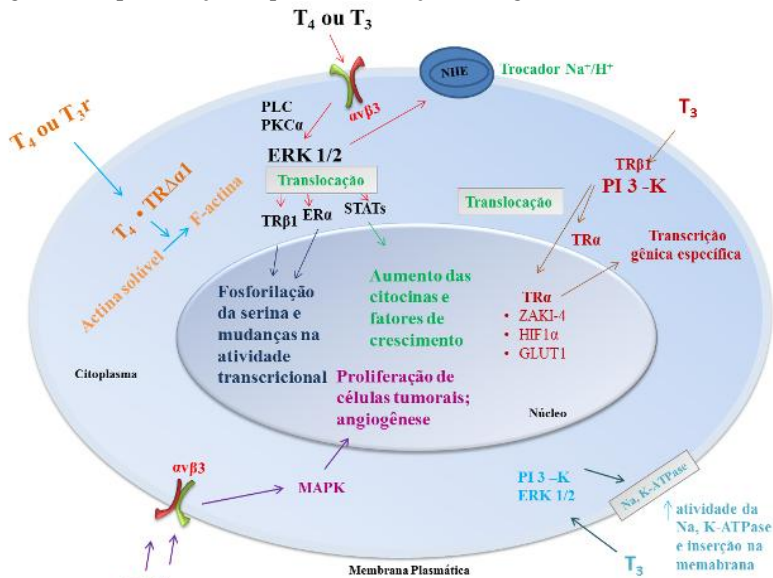
Os HT também podem influenciar, através de ações não genômicas, a internalização de proteínas da membrana plasmática, como as desidases (STACHELEK *et al.*, 2000). Ainda, alguns estudos com microscopia confocal, demonstraram que o receptor $TR\beta1$ reside no compartimento nuclear e no citoplasma das células, e que o T_3 promove a translocação deste receptor do citoplasma para o núcleo (ZHU *et al.*, 1998; BAUMANN *et al.*, 2001). $TR\alpha1$, que também está localizado no citoplasma, e pode ser translocado para o núcleo em células tratadas com T_4 (GRESPIN *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2009).

Dentre esses efeitos não clássicos está incluída a inibição da captação de GABA (MASON; WALKER; PRANGE, 1987), diminuição da atividade da Na^+K^+ -ATPase em sinaptossomas (SARKAR; RAY, 1993, 1998), aumento pré-sináptico do influxo de Ca^{++} (MASSON; WALKER; PRANGE, 1990, SARKAR; RAY, 1993, 1998, CHAKRABARTI; RAY, 2000) e modulação da dinâmica do citoesqueleto (ZAMONER *et al.*, 2006b, 2007b, 2008a, 2008b). Na figura 4 estão representadas algumas ações não genômicas já descritas para os HT.

Há mais de vinte anos, Faivre-Sarraillh e Rabie (1988), descreveram que a redução dos filamentos de actina no cerebelo de ratos hipotireoideos, que são restaurados pelo tratamento agudo com T_4 . Este foi o primeiro indício da capacidade dos HT para regular a dinâmica do citoesqueleto, um componente estrutural essencial para a migração celular e interação da célula com o ambiente. Posteriormente, Farwell e colaboradores (2005) demonstraram que a formação de F-actina em astrócitos pode ser modulada por T_4 ou T_3r através de mecanismos rápidos, não genômicos, enquanto o T_3 não altera o citoesqueleto de actina. Além disso, a formação de F-actina e a

organização dos microfilamentos na migração de neurônios do cerebelo também é dependente dos hormônios T_4 e T_{3r} , consistente com achados anteriores que descreveram que a polimerização da actina em astrócitos também é regulada por estes hormônios (FARWELL *et al.*, 1999).

Figura 4- Representação esquemática de ações não-genômicas dos HT



Fonte: Adaptado de Cheng; Leonard; Davis (2010).

Nosso grupo de pesquisa descreveu ações não genômicas do T_3 e do T_4 sobre a fosforilação do citoesqueleto através de mecanismos GABAérgicos em córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade (ZAMONER *et al.* 2006b). Por outro lado, apenas o T_4 estimulou a fosforilação de filamentos intermediários no córtex cerebral de ratos com 15 dias de idade através de mecanismos independentes dos neurotransmissores GABA, L-glutamato, noradrenalina e ATP, enfatizando mecanismos distintos e dependentes do estágio do desenvolvimento para os hormônios T_3 e T_4 sobre células neurais.

Dentre as ações não genômicas, que tem início através da interação dos HT com o receptor de superfície celular, Davis e

colaboradores (2008) descreveram que a interação do T₄ com o receptor de integrina $\alpha\beta 3$ ativa a MAPK (ERK1/2) causando a fosforilação da Ser-118 no receptor nuclear ER α . Quando este mecanismo ocorre em células humanas de câncer de mama (MCF-7), a ausência de estrógenos estimula a proliferação celular (LIN *et al.*, 2006). Por outro lado, também foi demonstrado que a ativação desta mesma via da MAPK pela ação não genômica dos HT induz a proliferação de células de glioblastoma humano, o tumor encefálico mais comum em adultos (GROSSMAN; BATARA, 2004).

Davis e colaboradores (2006) também demonstraram que os HT podem atuar como fatores de crescimento para o glioblastoma, uma justificativa para as observações clínicas que indicam que a indução farmacológica de hipotireoidismo leve com propiltiouracil (PTU) pode aumentar a sobrevida em pacientes com glioblastoma multiforme recorrente (GMB) (HERCBERGS *et al.*, 2003). Além disso, nosso grupo demonstrou que tanto o T₃ quanto o T₄ estimulam a proliferação de células de glioma C6 em cultura através da ativação de mecanismos não genômicos dependentes da RhoA-GTPase (ZAMONER *et al.*, 2007b).

Em conjunto, estes dados reforçam a hipótese de que a indução do hipotireoidismo clínico pode ser uma estratégia como adjuvante da terapia antitumoral. Neste contexto, o ácido tetraidotiroacético (TETRAC) pode ser utilizado sistematicamente para bloquear a ligação endógena dos HT com o receptor de integrina. O TETRAC compete com os hormônios no receptor de superfície da célula. A utilização desta estratégia não impediria a ação dos HT, especificamente do T₃, na respiração mitocondrial, bem como as ações genômicas deste hormônio que são mediadas diretamente pela sua interação com receptores intracelulares.

2.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR

Ações não clássicas, ou não genômicas dos HT, abrangem efeitos que não envolvem diretamente a expressão gênica. Essas respostas não genômicas são geralmente associadas com sinalização de segundos mensageiros que incluem as vias da PLC, IP₃, fosfatidil inositol 3-cinase (PI3K), diacilglicerol (DAG), PKC, proteína cinase A (PKA), AMP cíclico (AMPc), proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB), Ras, Raf1 serina/treonina cinase

(BASSETT; HARVEY; WILLIAMS, 2003; LÖSEL; WEHLING, 2003; MOELLER *et al.*, 2006; ZAMONER; PESSOA-PUREUR, 2011).

No SNC também têm sido relatados vários sítios de interação na membrana plasmática para HT, e ainda existem diversas hipóteses de que estes hormônios poderiam ter mecanismo de ação semelhante a neurotransmissores. Desta forma, os HT estariam atuando de maneira diferente de sua ação genômica clássica, regulando o desenvolvimento do sistema nervoso no início da vida fetal e pós-natal, sendo essenciais também em processos de aprendizado e memória (DRATMAN, 1974; MASON *et al.*, 1993; DRATMAN; GORDON, 1996; MARTIN *et al.*, 1996; SARKAR, 2002).

As proteínas cinases envolvidas em processos de aprendizado e memória incluem a proteína cinase dependente de Ca^{++} /calmodulina tipo II (CaMKII), a PKC e a PKA. Esta última pode ser ativada via adenilato ciclase ativada por Ca^{++} devido ao aumento intracelular deste íon induzido pela neurotransmissão glutamatérgica excitatória (BRADY *et al.*, 2012).

O termo PKC define uma família de serina/treonina cinases, as quais estão envolvidas no mecanismo de transdução de sinal de tirosina cinase e os receptores acoplados à proteína G. A isoforma convencional da PKC requer Ca^{++} , bem como DAG para sua ativação. Esta cinase tem uma distribuição heterogênea no SNC e desempenha um importante papel na regulação da excitabilidade neuronal, a liberação de neurotransmissores, e em longo prazo, alterações na expressão de genes e plasticidade sináptica (ABRIAL *et al.*, 2011).

A família das CaMKs pode ser considerada como responsável pela maioria dos efeitos do Ca^{++} , o qual induz a fosforilação da CaMK estimulando ou inibindo sua atividade. O melhor exemplo estudado desta família é a CaMKII, uma serina/treonina cinase multifuncional, encontrada em todas as células animais, mas especialmente no sistema nervoso, onde está altamente concentrada nas sinapses e medeia a fosforilação dependente de Ca^{++} de uma vasta variedade de alvos neuronais. A CaMKII é expressa em diferentes isoformas e a, CaMKII α , é expressa quase que exclusivamente no cérebro, onde é também extremamente abundante, constituindo mais de 1% do total de proteínas em algumas regiões do cérebro, tais como no hipocampo (ASHPOLE; HUDMON, 2011; MAGUPALLI *et al.*, 2012; SKELDING, *et al.*, 2012).

A PKA é regulada por um segundo mensageiro, o AMPc, o qual é sintetizado pela adenilato ciclase sob estímulo de receptores acoplados

a proteína G. A maior parte da PKA está especificamente associada com a membrana celular, por uma âncora de proteínas. A formação e a degradação do AMPc, e a ativação da PKA, ocorre em locais restritos no lado interno da membrana celular, para então iniciar uma reação localizada. Os substratos naturais da PKA são bastante diversificados, mas dentre eles podemos citar a produção de outras proteínas e enzimas do metabolismo intermediário (KRAUSS, 2003). As subunidades de PKA mostram uma ampla distribuição no cérebro, onde irão afetar muitas funções neuronais via fosforilação de uma ampla gama de substratos neuronais (ALBERTS *et al.*, 2011).

As MAPKs desempenham importantes papéis na fisiologia celular. Diversos sinais extracelulares podem ativar as cascatas das MAPKs, incluindo o neurotransmissor excitatório glutamato, fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento derivado de plaquetas - PDGF, fator de crescimento epidérmico - EGF e fator de crescimento de fibroblastos - FGF), citocinas pró-inflamatórias e estressores ambientais. A via MAPK envolve a fosforilação sequencial e ativação de três proteínas cinases, ou seja, MAPK, MAPK cinases (MAPKK ou MEK) e MAPKK cinases (MAPKKK). A fosforilação desta cinase ativará a MAPKK, esta por sua vez ativará diretamente a MAPK através da fosforilação de sítios Ser/Thr e tirosina. No final dessa cascata de sinalização, a MAPK irá fosforilar proteínas citoplasmáticas, proteínas de membrana e principalmente, proteínas nucleares, como fatores de transcrição, regulando, portanto, a modulação de uma série de genes (PEARSON *et al.*, 2001; BOUTROS *et al.*, 2008).

Os membros da família das MAPKs estão estrutural e funcionalmente relacionados, e ainda, muitos deles são expressos no cérebro e medeiam importantes funções neuronais, tais como modulação do metabolismo, neurotransmissão, neuroplasticidade (LTP e LTD, no hipocampo), sobrevivência ou morte celular (neurotoxicidade mediada pelo glutamato) e proliferação ou diferenciação celular. Os principais membros desta família são classificados em três grupos: ERKs; p38 MAPKs; e c-Jun N-Terminal cinases (JNKs) (KRISHNA; NARANG, 2008; KAPFHAMER *et al.*, 2012).

ERK1/2 regulam funções celulares importantes, como proliferação, diferenciação, apoptose e plasticidade sináptica. Estas cinases tem uma ampla gama de substratos e podem fosforilar muitas proteínas alvos no citosol ou no núcleo de células neuronais (NUTTALL; OTEIZA, 2012).

Já a ativação da via p38 MAPK influencia um grande número de processos celulares envolvidos na inflamação, imunidade, crescimento, diferenciação, progressão do ciclo celular e ativação de vias de morte celular (SCHWARTZ *et al.*, 2002). A p38 MAPK é ativada por estresse, respondendo a uma variedade de estímulos indutores, endógenos ou exógenos, dos quais se destacam a hiperglicemia, espécies reativas de oxigênio (ERO), estresse osmótico, radiação UV, choque térmico, hipóxia, isquemia, citocinas e fator de necrose tumoral - TNF (ROUX; BLENIS, 2004; BUITRAGO *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2008). A ativação da p38 desencadeia mudanças na fisiologia celular, incluindo modificação da expressão de proteínas citosólicas, de receptores membranares e organização do citoesqueleto, o que pode afetar o ciclo celular ou ocasionar apoptose (BOLAND *et al.*, 2005; TREISMAN, 2006).

2.3 HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO

O hipotireoidismo congênito refere-se à diminuição ou ausência dos níveis séricos de T_3 e T_4 ao nascer, podendo ser classificado em: primário: quando a deficiência hormonal se deve a incapacidade, parcial ou total, da glândula tireoide de produzir HT; central: quando há deficiência dos HT por falta de estímulo do TSH hipofisário ou do TRH hipotalâmico (RASTOGI, 2010).

O hipotireoidismo congênito tem incidência variável, ocorrendo de 1:1.800 nascidos vivos na Grécia, 1:10.000 na França (GAUDINO *et al.*, 2005). Aproximadamente 1:5000 crianças nascidas nos Estados Unidos apresentam problemas na tireoide. Na maioria dos casos, a causa para o não desenvolvimento normal da tireoide é desconhecida, segundo a Academia Americana de Pediatria (*American Academy of Pediatrics*, 2004). No Brasil, a prevalência de nascidos vivos que apresentam hipotireoidismo congênito é de 1:2500 (De Carvalho *et al.*, 2007). A triagem neonatal no Brasil é realizada conforme a Portaria GM/MS nº 822, de 6 de junho de 2001 por meio da medida do TSH em amostra de sangue colhida em um papel filtro (Teste do Pezinho), seguida de medida do T_4 (total ou livre) em amostras de soro quando o TSH é superior a 20 mUI/L. O tratamento precoce com doses elevadas de levotiroxina parece ser o mais adequado para pacientes com hipotireoidismo congênito (FISHER, 2000).

A indução do hipotireoidismo neonatal em ratos tem sido largamente utilizada, para entender o mecanismo pelo qual os HT

exercem suas ações no encéfalo em desenvolvimento. A deficiência experimental dos HT pode ser obtida pela tireoidectomia materna seguida por um tratamento com drogas antitiroideanas, ou também mantendo as ratas grávidas sob a ação de agentes antitiroideos, como 2-mercapto-1-metimazol ou 6-propil-2-tiouracil (PTU), durante o período de alta na concentração de receptores nucleares, que nos fetos de ratos corresponde ao último quarto da gestação, e depois do nascimento durante a amamentação (MORTE *et al.*, 2010; ZAMONER; PESSOA-PUREUR, 2011).

O hipotireoidismo congênito pode afetar a maturação do SNC e causar disfunções irreversíveis no cérebro tanto de humanos quanto de roedores (WONG; LEUNG, 2001). O hipotireoidismo neonatal provoca sintomas cardíacos, baixo ganho de peso e manifestações neurológicas severas (SELENKOW, 1975; WING *et al.*, 1994; POLAK, 1998; CAFFREY, 2000). A deficiência dos HT, mesmo que por curtos períodos de tempo, pode causar modificações permanentes na morfologia e fisiologias neurais (BERNAL, 2002), que são dependentes do período de desenvolvimento e da duração do déficit hormonal (ZOELLER; ROVET, 2004). O hipotireoidismo é descrito ainda como uma importante causa da demência reversível (CORDES *et al.*, 2000), onde a intervenção com T₄ pode ser utilizada como uma terapêutica eficaz (FYLKESNES; NYGGARD, 2000).

Os HT também tem ações importantes sobre o sistema GABAérgico, incluindo a atividade de enzimas envolvidas na síntese e metabolismo do GABA, sua liberação e recaptação, bem como os níveis dos receptores GABAérgicos no cérebro (WIENS; TRUDEAU, 2006). A Na⁺, K⁺-ATPase, uma enzima crucial responsável pelo transporte ativo de íons sódio e potássio no SNC, apresentou-se alterada em diferentes estruturas cerebrais em situações de hipo e hipertireoidismo (CARAGEORGIOU *et al.*, 2007a, 2007b).

Está bem estabelecido que mudanças da síntese dos HT, durante diferentes fases de desenvolvimento, podem causar alterações na proliferação celular, bem como mudanças nas defesas antioxidantes (DAS; CHAINY, 2004). Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que no hipocampo de ratos hipotireoideos com 15 dias de idade, há uma diminuição da síntese de glutathione (GSH), bem como diminuição na atividade das enzimas glutamina sintetase (GS), gama-glutamyltransferase (GGT) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), associados a um aumento na peroxidação lipídica. Estes dados podem estar envolvidos com dano neurotóxico observado no cérebro de ratos

hipotireoideos (CATTANI *et al.*, 2013). A diminuição na síntese de GSH pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo estresse oxidativo observado no cérebro dos animais hipotireoideos (DASGUPTA *et al.*, 2007; CATTANI *et al.*, 2013).

Cattani e colaboradores (2013) descreveram ainda, que o hipotireoidismo congênito está associado com desregulação do citoesqueleto, bem como diminui os níveis dos transportadores de glutamato nos astrócitos, levando a uma diminuição na captação de glutamato com subsequente influxo de Ca^{++} através dos receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) no hipocampo de ratos. Estes dados reforçam trabalhos anteriores do grupo demonstrando que o hipotireoidismo pode induzir a excitotoxicidade glutamatérgica (ZAMONER *et al.*, 2008a).

2.4 SISTEMA NERVOSO CENTRAL

As células do SNC, bem como as sinapses que controlam suas atividades não são estáticas, podendo sofrer modificações dinâmicas que levam a alterações na sua morfologia e na interrelação célula-célula (THEODOSIS *et al.*, 2004).

Dentre as células presentes no SNC podemos citar os neurônios, responsáveis pelas conexões sinápticas, e as células gliais que podem ser divididas em 3 subgrupos: (a) macroglia, como os astrócitos, glia radial e oligodendrócitos; (b) microglia; e (c) células ependimais, envolvidas na produção do fluido cefaloraquidiano (BRADY *et al.*, 2012). As células gliais representam o grupo mais numeroso de células neurais, e apresentam um importante papel prestando suporte estrutural, metabólico e trófico aos neurônios (KETTENMANN, RANSOM, 1995).

Embora as células gliais não sejam excitáveis, sabe-se que estas células liberam neurotransmissores em resposta à estimulação neuronal. Os neurotransmissores liberados de terminais pré-sinápticos durante a transmissão sináptica ativam receptores em astrócitos vizinhos, levando à liberação de transmissores derivados das células gliais. Os transmissores de astrócitos funcionam como sinalizadores para os neurônios. Assim, estes podem modular o nível de transmissão sináptica. Os astrócitos, por exemplo, podem liberar um agonista do receptor de glutamato que aumenta a transmissão sináptica excitatória (FELLIN *et al.*, 2004; ALLEN; BARRES, 2005).

2.5 HIPOCAMPO

O hipocampo está intimamente associado com o córtex cerebral, e nos primatas é localizado no lobo temporal medial abaixo da superfície cortical (Figura 5). Os seres humanos e outros mamíferos têm dois hipocampos, sendo um em cada hemisfério cerebral. O hipocampo pertence ao sistema límbico e desempenha importantes papéis com relação ao aprendizado, orientação espacial e ainda está envolvido com a consolidação de informações a curto prazo para a memória de longo prazo (KIM; FANSELOW, 1992; MORRIS, 2006; HOU, YANG, YUAN, 2013).

Figura 5 - Representação da estrutura hipocampal de humanos



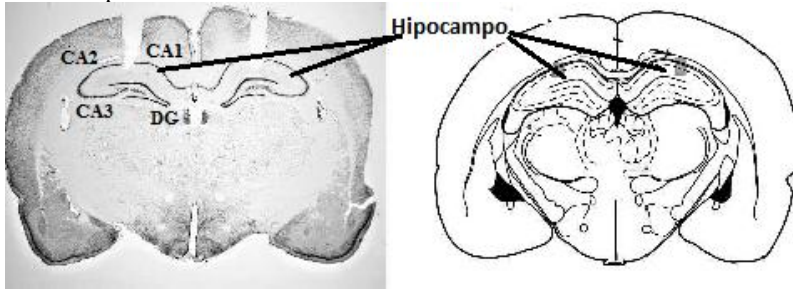
Formação do hipocampo acima do córtex entorrinal; e eixo transversal do hipocampo, camadas superficiais do córtex entorrinal, conectando com o giro dentado (DG), CA3, CA1 e o subcórtex (Sub).

Fonte: Small *et al.* (2011).

A formação hipocampal pode ser dividida em giro dentado, subcórtex, presubcórtex, parasubcórtex e córtex entorrinal. Por outro lado, considerando uma definição mais restrita, a formação do hipocampo se refere apenas ao hipocampo e ao giro dentado (DG). O DG é constituído de células granulares, e é considerado uma das importantes regiões do cérebro, pois possui a capacidade, ao longo da vida, de formar novos neurônios em mamíferos. No plano coronal, o hipocampo pode ser dividido em *Cornu ammonis* 1-3 (corno de Ammon; CA1-CA3) (HOU; YANG; YUAN, 2013). A figura 6 ilustra as subregiões do hipocampo de ratos.

As conexões neuronais no hipocampo são altamente ordenadas. O córtex entorrinal serve como porta de entrada para a formação hipocampal (figura 5). Os axônios dos neurônios no córtex entorrinal entram no DG e assim, formam as sinapses glutamatérgicas com células granulares do DG (SMALL *et al.* 2011; BRADY *et al.*, 2012).

Figura 6- Representação esquemática ilustrando as subregiões do hipocampo dorsal no plano coronal do cérebro de rato



Fonte: Adaptado de Stone *et al.* (2005).

A estrutura do hipocampo é um dos sistemas neuronais mais bem estudados no cérebro (AMARAL; WITTER, 1989; KIM; FANSELOW, 1992; LISTER *et al.*, 2006; BIRD; BURGESS, 2008; SMALL *et al.*, 2011). Dados experimentais em animais e seres humanos, como estudos de neuroimagem, têm implicado o envolvimento de alterações hipocampais na doença de Alzheimer, epilepsia do lobo temporal, envelhecimento cognitivo, amnésia, esquizofrenia, assim como em transtornos depressivos e de ansiedade (SMALL *et al.*, 2011). Sendo que, a maior parte das desordens neurais tem sido associadas a mudanças no metabolismo basal.

O metabolismo energético do cérebro é dependente da captação de glicose e do consumo de oxigênio. Desta maneira, o estado metabólico das estruturas do cérebro pode ser analisado *in vivo*, pela determinação da captação de glicose ou pelo consumo de oxigênio. Neste contexto, algumas doenças como a esquizofrenia estão associadas com o hipometabolismo do hipocampo, e outras patologias, como a depressão, parecem estar associadas com o hipermetabolismo desta área do cérebro (SMALL *et al.*, 2011). Além de alterações no metabolismo energético, o fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica também está

envolvido em doenças neurodegenerativas e distúrbios neuropsiquiátricos como convulsões, isquemia, doença de Alzheimer, Huntington e Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, esquizofrenia e outros distúrbios psiquiátricos (MICHAELIS, 1998; PATRICK, 2000; ALEKSEENKO, 2012).

O glutamato é responsável por produzir, cerca de 80 a 90% das sinapses no hipocampo. A atividade glutamatérgica pode ser responsável pelo gasto de aproximadamente 80% da energia do cérebro. A taxa metabólica cerebral de glicose em cérebro humano é aproximadamente 0,4 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tecido e o turnover do glutamato é de aproximadamente 0,8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tecido. Isto sugere que pelo menos parte das moléculas de glicose que entram no cérebro pode ser metabolizada até glutamato. Neste contexto, salienta-se que no cérebro de rato o *turnover* do glutamato é aproximadamente duas vezes o do cérebro humano (DANBOLT, 2001; BRADY *et al.*, 2012).

Devido à liberação maciça de glutamato durante a despolarização neuronal e o alto gradiente de concentração de glutamato entre o espaço intra e extracelular, estimou-se que cerca de 90% da demanda de glicose do cérebro é usada para manter os gradientes necessárias para captação de glutamato e despolarização neuronal (MAGISTRETTI; PELLERINI 1999).

2.6 GLUTAMATO

O aminoácido L-glutamato é o principal mediador de sinais excitatórios no SNC de mamíferos, e sua interação com receptores de membrana específicos é responsável por muitas funções incluindo: cognição, memória, movimento, aprendizado e formação de redes neurais durante o desenvolvimento (FONNUN, 1984; OTTERSEN; STORM-MATHISEN, 1984; GASIC; HOLLMANN, 1992; DANBOLT, 2001).

Este aminoácido também atua como precursor para o ácido γ -aminobutírico (GABA) em neurônios GABAérgicos e para glutamina em células gliais. Além disso, o glutamato é constituinte de proteínas e peptídeos, como a GSH (γ -glutamil-cisteinil-glicina), considerada o principal antioxidante não enzimático (MEISTER, 1983; MICHAELIS, 1998; DANBOLT, 2001; BRADY *et al.*, 2012; NICIU; KELMENDI; SANACORA 2012).

A barreira hemato-encefálica (BHE) essencialmente impede a entrada de glutamato no SNC. Desta forma, a maior parte do glutamato

presente no cérebro é sintetizado *de novo* pelos astrócitos. Estes agem impedindo a difusão do glutamato a partir da fenda sináptica, depois que o glutamato é liberado pelos neurônios. A eficiência desse processo resulta em um constante tráfego de glutamato a partir dos neurônios para os astrócitos. Considerando o glutamato um combustível metabólico valioso, ou ele é devolvido para os neurônios através do ciclo glutamato-glutamina ou então, é oxidativamente degradado (HERTZ *et al.*, 1999).

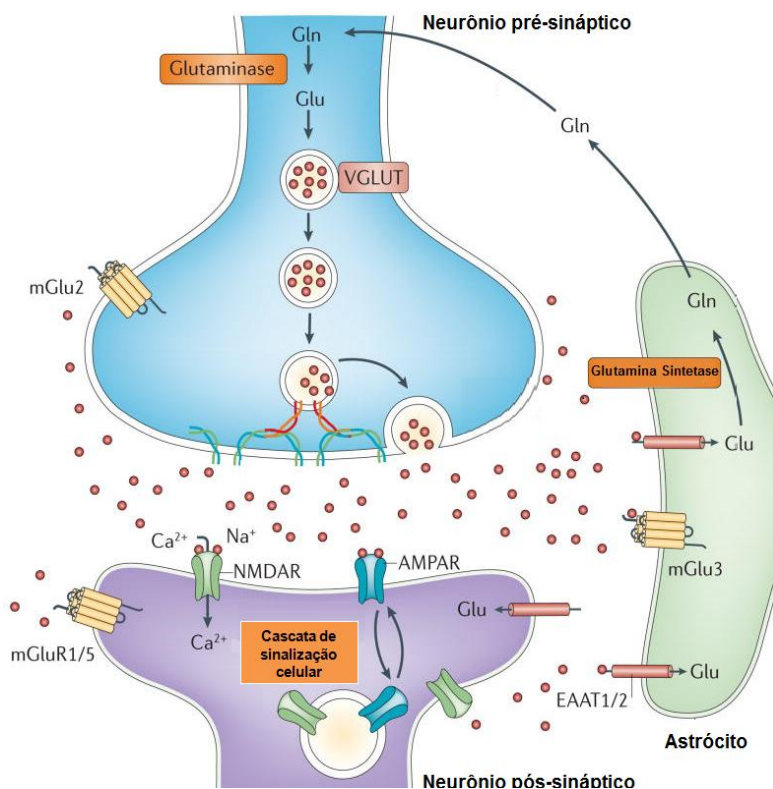
2.6.1 Receptores Glutamatérgicos

Os receptores de glutamato (GLURs) medeiam a maioria das transmissões sinápticas no SNC de mamíferos e, por consequência, tem sido extensivamente estudados nos últimos anos (STEINHASEUR; GALLOM, 1996).

Os GLURs podem ser divididos em duas categorias amplas: receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são receptores de canais iônicos cuja a abertura é favorecida quando o glutamato interagem com o receptor; e os receptores metabotrópicos (mGluRs) ativam ou inibem os sistemas de segundos mensageiros através da interação com a proteína G (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012). Tanto os receptores ionotrópicos quanto os metabotrópicos estão ligados a vários mensageiros intracelulares, tais como Ca^{++} , AMP cíclico, ERO, e iniciam várias cascatas de sinalização, as quais podem determinar o crescimento, diferenciação e sobrevivência neuronal (MICHAELIS, 1998).

Três classes de receptores ionotrópicos de glutamato foram identificados. Esses subgrupos estão nomeados com base na seletividade agonista de: NMDA, α -amino-3-hidroxi-5-ácido 4-metil-isoxazol propriônico (AMPA) e cainato (KA) (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012). A família dos receptores metabotrópicos compreende oito subtipos, subdivididos dentro de três grupos principais (mGLU₁, mGLU₂ e mGLU₃), tendo como base a similaridade das suas sequências de aminoácidos, as vias de transdução intracelular que ativam e a farmacologia de agonistas e antagonistas (CONN; PIN, 1997). O sistema de neurotransmissão glutamatérgica está representado esquematicamente na figura 7.

Figura 7 - Sistema de neurotransmissão glutamatérgica



A glutamina (Gln) é convertida a glutamato (Glu) pela ação da glutaminase. O Glu é empacotado em vesículas pré-sinápticas pelos transportadores Glu vesiculares (VGLUTs) e liberado pelos neurônios durante a neurotransmissão. O Glu é retirado do espaço extracelular através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) presentes predominantemente em células gliais. Em células gliais Glu é convertido a Gln pela Gln sintetase. Vários receptores Glu estão presentes em neurônios pré e pós-sinápticos, bem como em células gliais. Estes incluem os receptores ionotrópicos (AMPA, NMDA e cainato), bem como receptores metabotrópicos (mGluRs).
 FONTE: Popoli *et al.* (2011).

2.6.2 Metabolismo do Glutamato

Os níveis de glutamato extracelular são fortemente regulados com o intuito de impedir a excitotoxicidade glutamatérgica. O rígido

controle da neurotransmissão glutamatérgica é um processo dispendioso de energia, necessitando assim de altos níveis de glicose e consumo de oxigênio (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012). Uma vez sobreativado, esse sistema pode levar a excitotoxicidade. Um fator crucial na manutenção da homeostase do glutamato é o equilíbrio entre a liberação e metabolização de glutamato (SANACORA *et al.*, 2008).

Como todos os aminoácidos, o glutamato contém uma porção C-terminal e um N-terminal. A porção C-terminal e a espinha dorsal de carbono derivam da glicose, esta molécula por sua vez, atravessa a BHE através de uma família de moléculas transportadoras de glicose (GLUT) presente nas células endoteliais, astrócitos e neurônios. A glicose entra primeiro no compartimento dos astrócitos, e uma vez no meio intracelular, a glicose, ou é convertida a glicogênio através da reação da glicogênio sintase ou pode ser metabolizada à piruvato via glicólise. Este piruvato pode ser convertido a lactato, pela ação da lactado desidrogenase (LDH), ou a acetil-CoA e entrar no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) gerando α -cetoglutarato, o qual pode ser convertido a glutamato (PALMADA; CENTELLES, 1998; NEDERGAARD; TAKANO; HANSEN, 2002; NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012, COULTER; EID, 2012). É importante salientar que esta síntese de glutamato a partir da glicose ou lactato, com posterior liberação do glutamato das células, poderá esgotar o ciclo do TCA e seus intermediários.

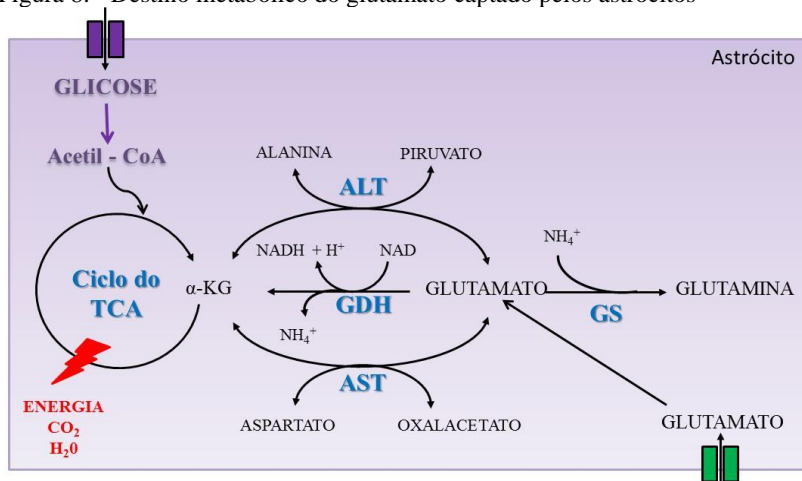
A reposição dos intermediários do ciclo do TCA, anaplerose, é, portanto, necessária para a continuada síntese de ATP. Os astrócitos são as únicas células capazes de realizar a anaplerose devido à sua expressão preferencial a piruvato carboxilase (PC), a qual é responsável por converter piruvato a oxaloacetato. Uma vez que os neurônios não possuem a capacidade de anaplerose, estes são criticamente dependentes dos astrócitos para a síntese de glutamato. Ainda o ciclo glutamato-glutamina, responsável por transferir a glutamina a partir dos astrócitos para os neurônios, e é fundamental para a síntese de glutamato nos neurônios (COULTER; EID, 2012).

Os astrócitos têm como principal função controlar a concentração de glutamato na fenda sináptica. Os transportadores astrocitários de glutamato, transportador glutamato/aspartato (GLAST) e o transportador L-glutamato (GLT-1) são responsáveis pelo maior “clearance” de glutamato liberado sinápticamente a partir do espaço extracelular. Uma vez acumulado nos astrócitos, o glutamato pode ser convertido a glutamina. Outro destino metabólico importante do

glutamato, é a reação com piruvato para formar alanina através da via da alanina aminotransferase (ALT). Uma vez nos neurônios, a alanina poderá fornecer seu grupo amino ao α -cetoglutarato, que é eficientemente convertido em glutamato através de uma reação de transaminação (ARMANO *et al.*, 2002). Além disso, grupo α -amino do glutamato também pode ser transferido ao oxaloacetato produzindo α -cetoglutarato e aspartato, em uma reação catalisada pela aspartato aminotransferase (AST). As reações de transaminação são reversíveis, podendo favorecer a formação de glutamato ou α -cetoglutarato, sendo que este pode ser oxidado no ciclo do TCA (HERTZ *et al.*, 1999; LANOUE *et al.*, 2001).

As aminotransferases, bem como o ciclo glutamato-glutamina, desempenham um papel importante no metabolismo do glutamato, e provem de uma interação entre astrócitos, neurônios e capilares sanguíneos, conforme demonstrado nas figuras 8 e 9.

Figura 8. - Destino metabólico do glutamato captado pelos astrócitos



ALT, alanina aminotransferase; GDH, glutamato desidrogenase; GS, glutamina sintetase; AST, aspartato aminotransferase; α -KG, α -cetoglutarato.

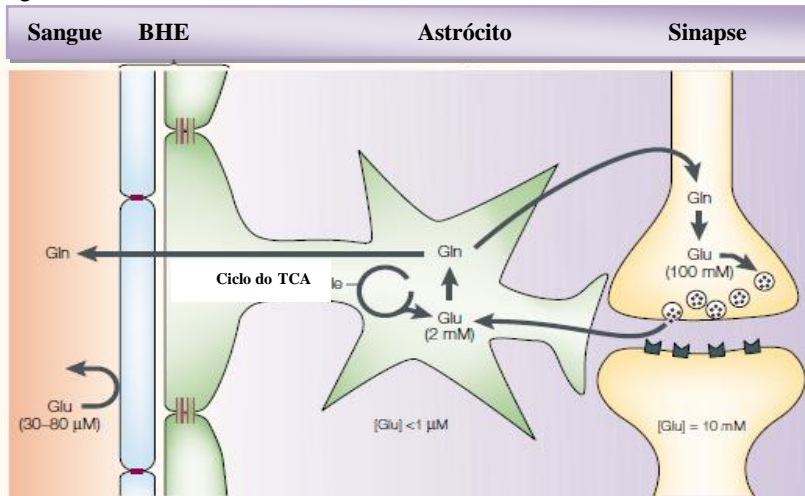
FONTE: Adaptado de Magistretti *et al.* (1999).

2.6.3 Ciclo Glutamato-Glutamina

Um importante aspecto da função astrocitária no cérebro é o controle homeostático da concentração extracelular de glutamato. Este

controle permite o correto funcionamento das sinapses e mantém o parênquima cerebral saudável. O excesso prolongado do glutamato no SNC pode levar a excitotoxicidade (PARPURA; VERKHRATSKY, 2012).

Figura 9 - Ciclo Glutamato-Glutamina



A barreira hematoencefálica tem baixa permeabilidade ao glutamato (Glu). Essencialmente todo o glutamato no cérebro é sintetizado por transaminação do α -cetoglutarato, tanto em neurônios quanto em células gliais. Nas células da glia, o glutamato é convertido em glutamina (Gln), antes de ser liberado para o espaço extracelular. A glutamina retorna para os neurônios e é convertida em glutamato, que é internalizado em vesículas sinápticas. Glutamina funciona também como transportador de amônia em excesso, sendo transportada através da barreira hematoencefálica para ser eliminada. A concentração de glutamato no fluido cefalorraquidiano é cerca de 1 μM , mas pode aumentar para 20 μM em condições patológicas caracterizadas por defeito na barreira hematoencefálica e/ou por dano celular, tais como acidente vascular cerebral, trauma, esclerose múltipla e meningite.

FONTE: Nedergaard; Takano; Hansen (2002).

O tráfego do glutamato e glutamina entre neurônios e astrócitos é chamado de ciclo glutamato-glutamina. O glutamato extracelular é captado por transportadores glutamatérgicos astrocitários, e uma vez no citosol, a glutamina sintetase (GS), uma enzima específica de astrócitos e oligodendrócitos, converte o glutamato em glutamina em uma reação

que requer ATP e amônia. Esta reação é importante para a detoxificação da amônia livre, pois seu acúmulo pode interferir com a função sináptica. O astrócito em seguida, exporta a glutamina para o fluido extracelular, de onde esta é captada por neurônios. Uma vez nos neurônios, a enzima glutaminase ativada por fosfato desamina a glutamina a glutamato, e este por sua vez é empacotado nas vesículas sinápticas por moléculas VGLUTs, lançado para o espaço extracelular e pode ser novamente captado por astrócitos e convertido de volta a glutamina pela GS, completando assim o ciclo metabólico (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012).

2.6.4 Excitotoxicidade Glutamatérgica

Apesar de seu papel como neurotransmissor, o glutamato pode ser tóxico aos neurônios, causando excitotoxicidade. A ativação dos receptores AMPA, pelo glutamato, despolariza a célula desbloqueando os canais NMDA, permitindo desta maneira, a entrada de Ca^{++} . Esta despolarização também ativa canais de Ca^{++} dependentes de voltagem (CCDV), liberando ainda mais glutamato. A entrada de Na^+ via receptor AMPA, contribui adicionalmente para a entrada de Ca^{++} por estimular a troca $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$. A ativação de receptores metabotrópicos, por sua vez, pode causar a liberação de Ca^{++} intracelular do retículo endoplasmático. A despolarização inibe ou reverte a captação de glutamato, aumentando assim, a concentração extracelular de glutamato (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993).

O aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{++} modula a atividade de proteínas cinases e fosfatases, que atuam na remodelação pós-sináptica e na expressão de genes que promovem a plasticidade neural, incluindo os fatores neurotróficos (LISMAN, 2003). Entretanto, a ativação excessiva dos receptores glutamatérgicos resulta em excesso de Ca^{++} intracelular, podendo ocasionar a morte neuronal, particularmente sob condições de estresse oxidativo e baixa disponibilidade de energia, levando assim, à excitotoxicidade glutamatérgica (MATTSON, 2003).

2.7 ESTRESSE OXIDATIVO

2.7.1 Espécies Reativas de Oxigênio

O oxigênio molecular (O_2) é considerado indispensável para a produção de energia em todos os animais, plantas, fungos e microrganismos aeróbios, sendo ele utilizado como aceptor final de elétrons, o que permite a elevada produção de energia na respiração celular mitocondrial, em consequência de seu alto potencial termodinâmico (WILHELM FILHO *et al.*, 2000).

Neste contexto, se cria um paradoxo, visto que o O_2 é indispensável para a vida e pode resultar também em danos reversíveis ou até irreversíveis. Os organismos aeróbios sobrevivem ao uso do O_2 devido às defesas antioxidantes existentes nas células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Devido à sua configuração eletrônica, o O_2 pode sofrer reduções parciais e levar à formação de radicais livres (FRIDOVICH, 1997). Em torno de 98% do oxigênio consumido em organismos aeróbios é reduzido de forma tetravalente até água (CHANCE *et al.*, 1979), através de reações enzimáticas na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. No entanto, cerca de 2% “escapa” desta redução completa e liga-se de forma monovalente, levando à formação de ERO.

A produção de ERO, e de espécies reativas nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte do metabolismo, sendo observada em condições fisiológicas (VASCONCELOS *et al.*, 2007). As ERO são geradas principalmente através de produtos intermediários do metabolismo celular oxidativo, pela redução incompleta do oxigênio à água, constituindo a classe mais importante de espécies radicalares geradas em organismos aeróbios. Esta terminologia é usada para incluir não só as espécies radicalares, mas também as espécies que não possuem elétrons desemparelhados, mas que são reativas devido à sua instabilidade, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) (INOUE *et al.*, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; VALKO *et al.*, 2007).

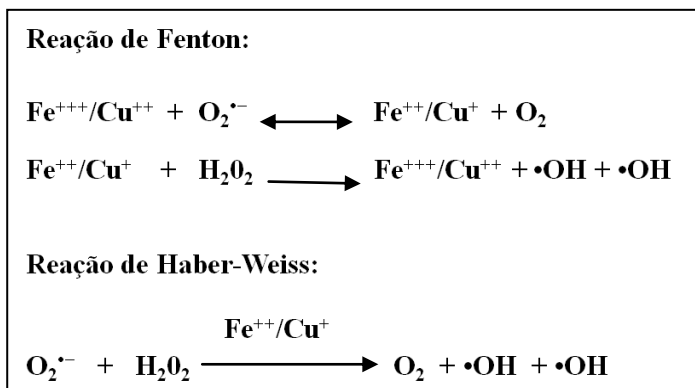
As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares, dentre estes, os de maior interesse do ponto de vista biológico estão o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\bullet OH$), radical peroxila ($ROO\bullet$) e radical alcóxila ($RO\bullet$); e os não-radicalares: 1O_2 , H_2O_2 e ácido hipocloroso ($HOCl$). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\bullet NO$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (SÁNCHEZ, 2012).

Os íons ferro e cobre são potentes catalisadores das reações de geração ERO, devido a seu papel ativo em reações de óxido-redução. A

participação desses metais se dá, especialmente, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; BARBOSA *et al.*, 2010). Embora o cobre e outros metais possam também catalisar estas reações, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais apto para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Na reação de Fenton ocorre à geração de $\bullet\text{OH}$, por meio da reação do H_2O_2 com estes íons. Na reação de Haber-Weiss, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\bullet-}$, a fim de gerar, da mesma forma, o $\bullet\text{OH}$ (BARBOSA *et al.*, 2010).

As equações das reações de Fenton e Haber-Weiss estão representadas abaixo.



A ligação do ferro e cobre às proteínas específicas, as quais são responsáveis pelo transporte, utilização e estoque destes, como a transferrina, a ferritina e a ceruloplasmina, previne e/ou minimiza as reações de geração de radicais livres catalisadas por esses metais (KOURY; DONANGELO, 2003).

O estresse oxidativo pode resultar de uma situação em que há uma diminuição nos níveis das enzimas antioxidantes, uma elevada velocidade de produção de ERO ou uma combinação de ambas as condições (DRINGEN, 2000; HALLIWELL, 2007).

O cérebro pode ser particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido sua alta demanda por oxigênio pela cadeia respiratória (MENON; RAMALINGAM; KUMAR, 2012). Esta, que por sua vez, é a maior fonte de ERO intracelular. A maior parte da ocorrência de ERO ocorre como um resultado da redução parcial do oxigênio molecular,

formando o $O_2^{\bullet-}$, que pode ser precursor de várias ERO, incluindo H_2O_2 , e $\bullet OH$, bem como as moléculas orgânicas, tais como os radicais $RO\bullet$ e $ROO\bullet$ (DASURI; ZHANG KELLER, 2012).

2.7.2 Peroxidação Lipídica

Todos os componentes celulares estão sujeitos à ação das ERO, sendo que as membranas constituem os alvos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica constitui reações em cadeia nos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, alterando a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas (BOWLES *et al.*, 1991; GOODE *et al.*, 1995). Este processo pode ocasionar alterações no transporte iônico, como perda da seletividade, inibição de processos metabólicos, e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (MELLO; HOFFMAN; MENEGHINI, 1983; HERSHKO, 1989; NIGAM; SCHEWE, 2000).

2.7.3 Sistema de defesa Antioxidante

Em 1995, Halliwell e Gutteridge, definiram antioxidantes como, “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com o substrato oxidável, atrasa significativamente ou inibe a oxidação deste substrato”. Mais tarde, eles definiram como “qualquer substância que atrasa, impede ou elimina os danos oxidativos das moléculas alvo” (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Existe ainda, um sistema de reparo que atua quando a prevenção e a interceptação não foram completamente efetivas e os produtos da destruição pelos radicais livres estão sendo continuamente formados em baixas quantidades e, desta forma, podem se acumular no organismo (SANTOS; CRUZ, 2001).

Os antioxidantes endógenos desempenham um papel crucial na manutenção de funções celulares. O sistema antioxidante enzimático mais eficiente envolve a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). E o sistema antioxidante não enzimático inclui as vitaminas E e C, bem como os antioxidantes tióis (GSH, tioredoxina, ácido lipídico), os carotenoides, os flavonoides, entre outros (RAHMAN, 2007).

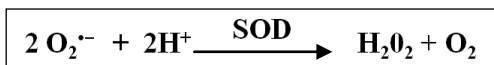
2.7.4 Antioxidantes Enzimáticos

Através da ação das enzimas antioxidantes, as células tentam manter baixas as quantidades de $O_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 , evitando assim a formação do $\bullet OH$, que é altamente reativo e deletério às células (BOVERIS; CADENAS, 1997). A SOD converte o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (FRIDOVICH, 1974). A CAT converte o H_2O_2 a H_2O e O_2 , enquanto a GPx converte o H_2O_2 , ou outros hidroperóxidos, até H_2O , com oxidação da GSH para formar a glutathiona oxidada (GSSG) (CHANCE *et al.*, 1979).

As defesas enzimáticas secundárias incluem a GR e a G6PD. A GR reduz GSSG a GSH, enquanto a G6PD regenera o NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido), uma coenzima utilizada em reações anabólicas, favorecendo a criação de um ambiente redutor. É importante salientar que estas duas enzimas não neutralizam diretamente os radicais livres, mas elas têm um importante papel secundário para outros antioxidantes endógenos (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

2.7.4.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ altamente reativo em H_2O_2 , uma espécie menos reativa, a qual posteriormente será metabolizada pela ação das enzimas CAT e GPx (MATÊS; PÉREZ-GOMES; NÚNES DE CASTRO, 1999). A equação da reação catalisada pela SOD está representada abaixo.

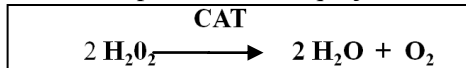


Nos seres humanos a SOD pode ser expressa de três diferentes formas: citosólica Cu/Zn-SOD que constitui a primeira linha de defesa antioxidante. Esta forma da SOD requer a presença de íons de cobre e zinco no seu sítio ativo, o cobre é essencial para a atividade catalítica da enzima e o zinco promove a estabilidade da estrutura proteica. mitocondrial Mn-SOD, e extracelular SOD (EC-SOD), esta forma da SOD por sua vez é secretada no espaço intersticial dos tecidos e dos fluídos extracelulares e é responsável pela atividade da SOD presente no plasma, linfa, e fluído sinovial (SUN *et al.*, 1995, SÁNCHEZ, 2012). A dismutação do $O_2^{\bullet-}$ ocorre de forma natural; porém a ação da SOD

permite a eliminação do $O_2^{\bullet-}$ mesmo em baixas concentrações (BOVERIS; CHANCE, 1973; CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979).

2.7.4.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma hemoproteína tetramérica consistindo de quatro subunidades idênticas que é responsável pela detoxificação específica de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Esta enzima apresenta elevada eficiência catalítica, e desta maneira, parece ser o sistema mais eficiente e elaborado em plantas e animais para controlar as concentrações de H_2O_2 (MONTAVON; KUKI; BORTLIK, 2007). A CAT está localizada na matriz dos peroxissomas e na mitocôndria; porém, nos eritrócitos esta enzima é encontrada no citoplasma (SÁNCHEZ, 2012). A reação catalisada pela CAT está representada na equação abaixo.



2.7.4.3 Glutationa Peroxidase (GPx)

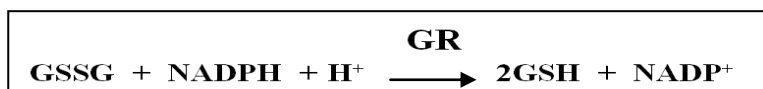
As GPx são enzimas dependentes de selênio (Se) e constituem um dos sistemas antioxidantes mais importantes da célula (SÁNCHEZ, 2012). Estas enzimas contêm um átomo de Se45 unido a um resíduo de cisteína no seu sítio ativo (HUBER *et al.*, 2008). Todas as GPx catalisam a redução do H_2O_2 , usando a GSH como substrato, protegendo assim as células de mamíferos contra danos oxidativos (NORDBERG; ARNÉR, 2001). A GPx converte o H_2O_2 , ou outros hidroperóxidos, até H_2O , com oxidação da GSH para formar a GSSG (CHANCE *et al.*, 1979). O metabolismo da GSH consiste em um dos principais mecanismos de defesa frente ao estresse oxidativo (RAHMAN, 2007). A reação catalisada pela GPx está representada a seguir:



2.7.4.4 Glutationa Redutase (GR) e Glicose-6P-Desidrogenase (G6PD)

A GR catalisa a redução da GSSG a GSH, à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). A distribuição celular da GR é similar a da GPx (SÁNCHEZ, 2012).

A atividade da G6PD está envolvida com as defesas antioxidantes fornecendo os equivalentes redutores (NADPH) para regeneração de GSSG em GSH. Quando o fornecimento de NADPH fica prejudicado, a função antioxidante da GSH também é afetada, pois a GSSG não pode ser regenerada, causando sérios danos ao metabolismo celular. Neste sentido, a G6PD também pode ser considerada uma enzima antioxidante coadjuvante (SLEKAR; KOSMAN; CULOTTA, 1996). A equação da reação catalisada pela GR está representada abaixo.

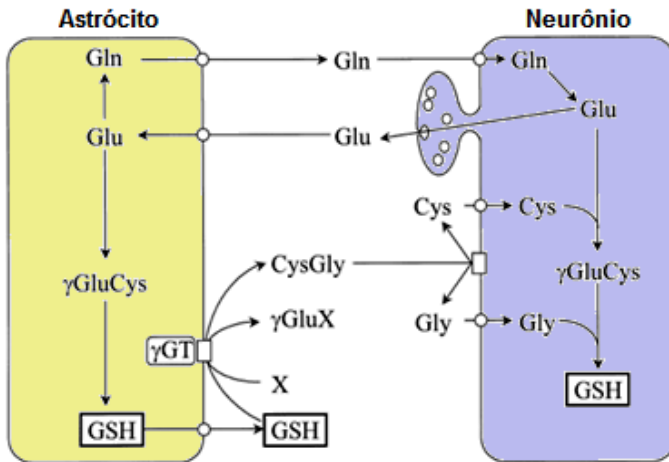


2.7.4.5 Gamma-Glutamil Transferase (GGT)

A GGT é uma glicoproteína ligada à membrana celular, responsável pela transferência de grupos γ -glutamil da GSH para inúmeros aminoácidos ou peptídeos. Sua ação permite a captação de cisteína, elemento limitante para a síntese *de novo* GSH (MEISTER, 1983). A GGT é, portanto, responsável pela degradação da GSH aumentando a disponibilidade dos aminoácidos para síntese proteica, assim como para a síntese *de novo* de GSH (TATEISHI *et al.*, 1977). Além disso, a GGT também catalisa o metabolismo de compostos endógenos, como leucotrienos e xenobióticos, após sua conjugação com a GSH. Várias substâncias, que são capazes de gerar ERO/ERN, aumentam a expressão da GGT na maioria das células e tecidos. Sendo assim, a GGT desempenha um papel crítico na defesa antioxidante, na detoxificação de xenobióticos e em processos inflamatórios (DICKINSON; FORMAN, 2002a; ZHANG *et al.*, 2005; ZHANG; FORMAN, 2009).

Acredita-se que ocorre uma interação metabólica entre os neurônios e as células gliais para a síntese de GSH, sendo que a disponibilidade da cisteína, clivada pela GGT, determina o nível de GSH neuronal. Dringen e colaboradores (2000) desenvolveram uma hipótese de interação metabólica entre astrócitos e neurônios com relação ao metabolismo da GSH, onde a GSH liberada das células gliais serve como substrato para a GGT astroglial. A figura 10 representa esta hipótese.

Figura 10- Interação metabólica entre astrócitos e neurônios na modulação do metabolismo da GSH



A GSH liberada das células gliais serve como substrato para a GGT astroglial. X representa um aceitador da porção γ -glutamil, transferida da GSH pela GGT. O dipeptídeo Cys-Gly serve como um precursor da GSH neuronal. Adicionalmente, a glutamina é liberada pelos astrócitos e utilizada pelos neurônios como um precursor para a síntese de glutamato, um aminoácido necessário para a síntese de GSH.

Fonte: Adaptado de Dringen; Gutterer; Hirrlinger (2000).

2.7.5 Antioxidantes Não Enzimáticos

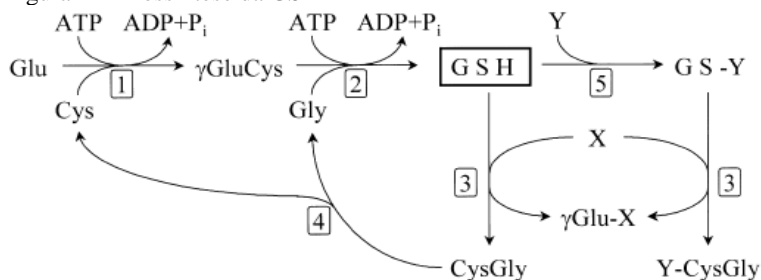
Os sistemas de defesas antioxidantes não enzimáticos são capazes de prevenir o dano oxidativo por interações diretas e indiretas com ERO (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Dentre os antioxidantes não enzimáticos endógenos destacam-se a GSH, o ácido úrico, a bilirrubina, os hormônios sexuais, a melatonina, o ácido lipóico, os α -cetoácidos e a coenzima Q (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Os antioxidantes não enzimáticos exógenos ou nutricionais incluem as vitaminas E, C e A, além de carotenoides como o licopeno e o β -caroteno, flavonoides, entre outros (SCANDALIOS, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

2.7.5.1 Glutathiona Reduzida (GSH)

A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes na defesa das células contra o estresse oxidativo. Esta molécula apresenta papel redutor em muitas reações, tendo uma função importante na detoxificação do H_2O_2 , outros peróxidos e radicais livres. Além disso, desempenha outras funções como a proteção de grupos sulfidrilas (-SH) de proteínas contra oxidação, serve como transportadora e reservatório da cisteína, modula processos celulares como a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HUBER ; ALMEIDA; De FÁTIMA., 2008; SÁNCHEZ, 2012).

A biossíntese da GSH ocorre no ambiente intracelular, pela ação consecutiva de duas enzimas. Na primeira reação, é formada uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutamato e cisteína, catalisada pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase, levando à γ -L-glutamil-L-cisteína. Este dipeptídeo é então ligado à glicina pela ação da glutathiona sintetase. Estas etapas requerem ATP e Mg^{+2} (HUBER; ALMEIDA; De FÁTIMA 2008). A biossíntese da GSH está representada na figura 11.

Figura 11- Biossíntese da GSH



A GSH é sintetizada por duas reações consecutivas com consumo de ATP. A primeira reação necessita da presença de glutamato e ocorre pela atividade da enzima γ -glutamilcisteína sintetase (1) e a segunda reação pela atividade da enzima glutathiona sintetase (2). A GSH é um substrato da GGT (3). X representa um aceitador da porção de γ -glutamil, transferido da GSH pela ação da GGT. O dipeptídeo CysGly é gerado em concentrações equimolares ao de GSH (4). A GSH intracelular é conjugada pela Glutathiona-S-Transferase (5).

Fonte: Dringen; Gutterer; Hirrlinger (2000)

2.7.6 Estresse Oxidativo e Hormônios da Tireoide

Os HT exercem um papel crucial no desenvolvimento e nas funções do SNC. A indução do hipotireoidismo e do hipertireoidismo em modelos animais, pode causar inúmeras anormalidades no desenvolvimento, como neurodegeneração; dano, desorganização e deformação de neurônios e dendritos, entre outros. Estas desordens talvez possam ser atribuídas, pelo menos em parte, ao estresse oxidativo devido a prejuízos nos sistemas de defesa antioxidante (AHAMED *et al.*, 2012).

Em modelos animais, o hipertireoidismo diminui o tempo de sobrevida, e com o avanço da idade, observa-se deficiência na mielinização. Os autores sugerem que estes eventos estão relacionados a estresse oxidativo devido ao excesso de HT (PASQUINI; ADAMO, 1994). Além disso, Yavuz e colaboradores (2008) demonstraram que a terapia de supressão do TSH com T₄ acarreta em hipertireoidismo subclínico, ocasionando a estresse oxidativo em pacientes eutiroideos com bócio nodular. Por outro lado, Abalovich e colaboradores (2003) observaram indução de estresse oxidativo devido a diminuição das defesas antioxidantes em pacientes com doença de Graves. Em ratos com hipotireoidismo, a geração de estresse oxidativo foi associada com o declínio nos níveis de GSH como uma das primeiras manifestações observadas (RAHAMAN *et al.*, 2001).

Dasgupta e colaboradores (2007) demonstraram que os HT são capazes de estimular a síntese da GSH, através da regulação da atividade da enzima γ -glutamilcisteína, sugerindo que estes hormônios desempenham um efeito neuroprotetor frente ao estresse oxidativo. Além disso, os autores mostraram que os HT têm a capacidade de melhorar a eliminação do H₂O₂ nos astrócitos. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que o hipotireoidismo induz excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo tanto em córtex cerebral (ZAMONER *et al.*, 2007a) quanto em hipocampo de ratos imaturos (CATTANI *et al.*, 2013), reforçando a importância dos HT para o correto funcionamento dos sistemas de defesa frente a espécies reativas.

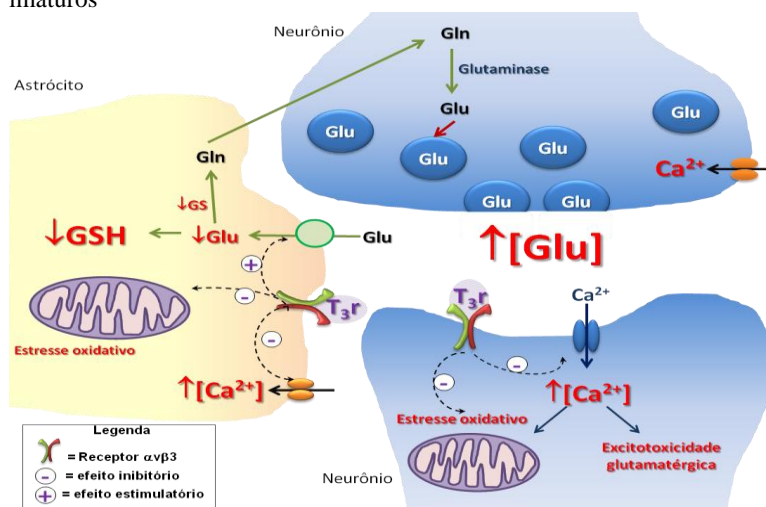
Considerando a GSH como um componente essencial na função neuroprotetora astrocitária, uma diminuição nos níveis de GSH, associada com um aumento no nível da peroxidação lipídica pode ser

responsável por induzir o dano neurotóxico no cérebro de ratos com hipotireoidismo (CATTANI *et al.*, 2013).

3. HIPÓTESE

Considerando-se que o hipotireoidismo induz estresse oxidativo e excitotoxicidade glutamatergica, este estudo pretende demonstrar se o T_{3r} pode reverter, pelo menos algumas, dessas alterações em hipocampo de ratos imaturos através de mecanismos não genômicos via ativação do receptor de superfície, o dímero de integrina $\alpha_v\beta_3$. Para comprovar esta hipótese, foram estudadas as ações rápidas deste hormônio sobre o hipocampo de ratos hipotireoideos avaliando-se diferentes parâmetros bioquímicos: influxo de $^{45}\text{Ca}^{++}$, captação de $[^{14}\text{C}]$ -desoxiglicose, atividade das aminotransferases (AST e ALT), atividade das enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante, bem como níveis de GSH, TBARS e proteína carbonilada. A figura 12 apresenta esquematicamente a hipótese deste estudo.

Figura 12.- Possíveis alvos do T_{3r} em hipocampo de ratos hipotireoideos imaturos



O hipotireoidismo leva ao acúmulo de Ca^{++} intracelular, diminui a captação de glutamato (Glu) e induz estresse oxidativo. Nossa hipótese de estudo é de que o T_{3r} interage com receptores de superfície (dímeros de integrina $\alpha_v\beta_3$) inibindo o influxo de cálcio, estimulando a captação e metabolismo do glutamato, assim como revertendo o estresse oxidativo e a excitotoxicidade glutamatergica induzida pelo hipotireoidismo congênito. GS = glutamina sintetase. Os efeitos do hipotireoidismo estão destacados em vermelho.

Fonte: Adaptado de Cattani *et al.* (2013).

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

As substâncias radiotivas, [$^{45}\text{Ca}^{2+}$]- CaCl_2 (sp. act. 321 KBq/mg Ca^{++}) e ^{14}C -2-deoxi-D-glicose (^{14}C -DG), (sp act 9.25 GBq/mmol) foram obtidos da “Du Pont NEN Products” (Boston, EUA), e o líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III foi adquirido da Perkin Elmer (São Paulo, SP, Brasil). Os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo, todos os inibidores enzimáticos, antagonistas de receptores, bloqueadores de canais, substâncias antioxidantes, foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). O “ImmobilonTM Western chemiluminescence HRP substrate kit” foi adquirido da Millipore (©EMD Millipore Corporation, Bilerica, Ma, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Tratamento dos animais

Foram utilizados ratos Wistar Machos com 15 dias de idade ou ratas Wistar fêmeas gestantes, provenientes do Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em gaiolas com controle do ciclo claro/escuro 12/12 h a 21 °C, com água e ração *ad libitum*. Foram seguidos os Princípios Éticos do COBEA durante todos os experimentos. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela CEUA/UFSC (PP00318 e PP00820).

4.2.1.1 Ensaios *in vivo*

Para indução do hipotireoidismo, ratas Wistar fêmeas foram expostas ao PTU 0,05% na água de beber desde o 8º dia gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade, que corresponde ao período imaturo do desenvolvimento. Os animais foram eutanaziados por decapitação, seguida de rápida remoção do hipocampo. Os testes bioquímicos foram realizados em fatias de hipocampo. As fatias foram homogeneizadas nos tampões específicos dependendo da determinação bioquímica a ser realizada.

A padronização do modelo experimental de hipotireoidismo congênito induzido foi previamente demonstrada pelo grupo de

pesquisa. A tabela 1 mostra as alterações nos níveis hormonais no soro dos filhotes de ratas tratadas com 0,05% de PTU na água de beber desde o 8º dia gestacional até a prole completar 15 dias de idade. Os dados demonstram o desenvolvimento de um quadro clássico de hipotireoidismo com diminuição nas concentrações séricas de T₃ total e livre (TT₃ e FT₃, respectivamente), bem como de T₄ total e livre (TT₄ e FT₄, respectivamente), que estão associadas ao aumento nos níveis de TSH.

Tabela 1 - Níveis séricos dos hormônios da tireoide e do TSH em soro de ratos imaturos de 15 dias de idade.

Hormônio	Eutireoideo	Hipotireoideo
TT ₃ (ng/mL)	8,75 ± 0,01	0,69 ± 0,002
FT ₃ (ng/mL)	3,14 ± 0,018	0,38 ± 0,0021
TT ₄ (ng/mL)	6,11 ± 0,001	0,80 ± 0,001
FT ₄ (ng/mL)	2,47 ± 0,015	0,25 ± 0,0017
TSH (ng/mL)	0,87 ± 0,0028	4,47 ± 0,0035

Fonte: Cattani *et al.* (2013)

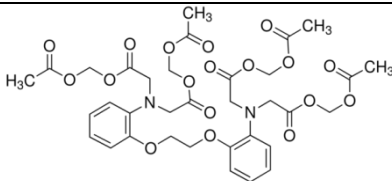
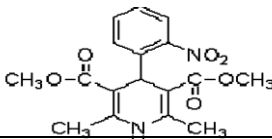
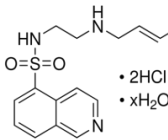
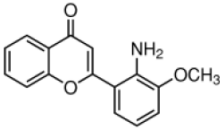
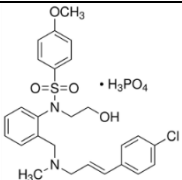
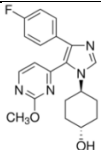
4.2.1.2 Tratamento *in vitro* das fatias de hipocampo

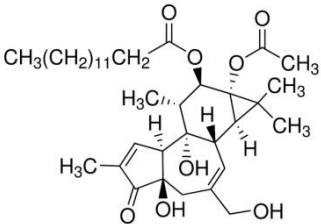
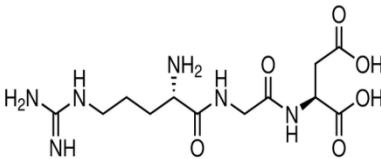
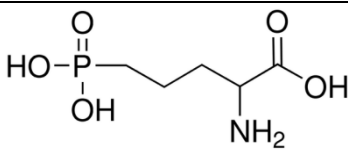
Para todos os experimentos as fatias de hipocampo foram previamente pré-incubadas por 15 min. em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb = NaCl 122mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10mM) gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂), seguido por uma incubação de 30 minutos com ou sem os hormônios (T₃, T₄ ou T_{3r}).

Com o intuito de investigar os mecanismos envolvidos na atividade dos hormônios sobre as células hipocâmpais, em alguns experimentos as fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de inibidores enzimáticos (KN-93 10 µM; PD98059 10 µM; Nifedipina 10 µM; PMA 1µM; BAPTA-AM 50µM; H89 10 µM; SB239063 10 µM), e/ou antagonistas de receptores (AP-5 10 µM; RGD 500 nM), que foram mantidos durante a incubação de 30 minutos com ou sem os hormônios.

Os bloqueadores e inibidores utilizados podem ser visualizados na tabela 2.

Tabela 2 - Compostos utilizados para estudar o mecanismo de ação do T₃r sobre as células hipocampus.

Composto	Ação farmacológica	Estrutura química
BAPTA-AM	Quelante de Ca ²⁺ intracelular	
Nifedipina	Bloqueador dos CCDV-L	
H-89	Inibidor da PKA	 • 2HCl • xH2O
PD 98059	Inibidor da MEK1/2, rota ERK 1/2	
KN-93	Inibidor da CaMKII	 • H3PO4
SB239063	Inibidor da p38 MAPK	

PMA	Ativador de PKC	
RGD	Antagonista de receptor $\alpha\beta 3$	
AP-5	Antagonista de receptor do tipo NMDA	

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/>

4.2.2 Captação de Cálcio

A captação de $^{45}\text{Ca}^{++}$ (ZAMONER *et al.*, 2007a) foi determinada em fatias de hipocampo de ratos hipotireoideos tratados ou não com T_3r . Para tanto, o tecido foi pré-incubado em tampão KRB por 15 min a 37°C , pH 7.4. Após, isso o meio de incubação foi trocado por KRB fresco contendo $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ $^{45}\text{Ca}^{++}$ e o tecido incubado durante 30 minutos na presença ou ausência de T_3r (10^{-9} M). O $^{45}\text{Ca}^{++}$ extracelular foi totalmente lavado com solução de lantânio (NaCl 127,5 mM, KCl 4,6 mM, MgSO_4 1,2 mM, HEPES 10 mM, Glicose 11 mM, LaCl_3 10 mM, pH 7.3). O tecido foi lisado em solução NaOH 0,5 M e foi determinada a concentração de proteínas em cada amostra. A radioatividade foi medida em um cintilador. Captação específica foi considerada como a diferença entre a captação total e a não específica. Os resultados foram expressos como $\text{pmol } ^{45}\text{Ca}^{++}/\mu\text{g}$ proteína ou % do controle.

4.2.3 Conteúdo de GSH

Os níveis de GSH foram medidos em fatias de hipocampo controles e hipotireoideos e incubadas na presença ou ausência do T_3 (10^{-9} M) por 30 ou 60 min, e posteriormente, o tecido foi homogeneizado em ácido tricloroacético 12% (1:10, P:V), seguido por centrifugação a 5000 x g durante 5 minutos. Uma alíquota de 50 μ L das amostras foi acrescentada em 950 μ L de Tampão Fosfato 0,2 M pH 8,0.

Posteriormente, 100 μ L de ácido 5,5'-Ditio-bis(2-nitrobenzóico) 2,525 mM (DTNB; Reagente de Ellman) foram adicionados a cubeta e a absorbância foi medida em comprimento de onda de 412 nm (BEUTLER; DURON; KELLY, 1963). GSH reage com DTNB e por redução de GSSG, a GSH total (GSH + GSSG) pode ser medida. DTNB reage com GSH para produzir um ânion conjugado, TNB, que pode ser detectado por fluorescência ou absorbância e é proporcional à quantidade inicial de GSH (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009). Os resultados foram expressos em gráficos como conteúdo de GSH em mmol/ μ g proteína.

4.2.4 Determinação dos marcadores de danos oxidativo

4.2.4.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS

A avaliação do dano oxidativo lipídico foi realizada no homogeneizado através da detecção de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o produto majoritário, malondialdeído (MDA), produzindo uma base de Schiff de coloração rosa, os quais são derivados de oxidação do processo de lipoperoxidação (BIRD; DRAPER, 1984). O método consiste na precipitação do homogenato do hipocampo (100 μ L) com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 12%, seguido da incubação em 900 μ L de tampão tris-HCl 60 mM 7,4 e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min. a 100 °C. Posteriormente, o material foi resfriado em banho de gelo, centrifugado (5.000 x g por 5 min), e a mensuração do cromóforo rosa foi detectada 535 nm, os valores foram expressos em nmol MDA.g⁻¹.

4.2.4.2 Proteína carbonilada

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado no homogeneizado do hipocampo pelo método descrito por Levine e

colaboradores (1990). Inicialmente, foram adicionados 100 μL da amostra em 600 μL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 mM preparado em solução de HCl 2 N, seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação contínua. Após, foi adicionado 600 μL de TCA 20 %, com agitação e banho de gelo durante 10 min, seguido de centrifugação (5 min a 10.000 x g), e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 min a 10.000 x g), com 800 (1:1 v/v). Finalmente, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete e foram adicionados 900 μL de guanidina 6,0 M preparada em solução de KH_2PO_4 20 mM, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C com agitação contínua por 60 min, para posteriormente proceder a leitura a 360 nm. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol.mg^{-1} proteína.

4.2.5 Atividade enzimática

As fatias de hipocampus foram pré-incubadas por 15 min. em tampão KRB, e depois incubadas durante 30 min com ou sem os HT.

4.2.5.1 Glutathione redutase

Para o ensaio da GR os homogeneizados do hipocampo foram submetidos ao método de Calberg e Mannervick (1985), o qual verificou em 340 nm a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de GSH, a partir da GSSG, pela ação desta enzima presente na amostra. Um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutathione oxidada e DPTA 5 mM foi adicionado na cubeta (0,95mL), e a adição de 50 μL do homogenato do hipocampo deu início a reação que foi monitorada durante 3 minutos, gerando uma curva descendente. Os valores da atividade desta enzima foram também expressos em $\mu\text{mol. g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

4.2.5.2 Glutathione peroxidase

Para a análise enzimática de GPx o método de Flohé e Gunzler (1984) foi utilizado, no qual a reação é baseada na redução de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx, e conseqüente regeneração de GSH através da enzima GR, com oxidação de NADPH em 340 nm. Portanto, a

velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade de GPx na amostra. Para a realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7.0), 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) a 5 mM, 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de GR, no momento do ensaio. Em seguida, foram adicionados 10 μ L de t-BuOOH e 10 μ L do homogenato do hipocampo em 1 mL de um meio de reação na cubeta. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

4.2.5.3 Catalase

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Aebi (1984), que é baseado na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Adicionou-se 2 mL desta solução na cubeta, com acréscimo de 20 μ L do homogenato de hipocampo, em seguida realizou-se leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 30 segundos. Os valores foram expressos em $\text{mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

4.2.5.4 Glicose-6-fosfato Desidrogenase

Para o ensaio da enzima G6PD, as fatias de hipocampo foram incubados por 30 min com ou sem $\text{T}_{3\text{r}}$, homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4, e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). Uma alíquota do homogeneizado foi incubada na presença de NADP⁺ levando a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato. O NADPH produzido foi quantificado de modo cinético a 570 nm durante 10 minutos. Os resultados foram calculados pela avaliação do aumento da densidade óptica por minuto (declínio) da amostra contra o "declínio" da atividade enzimática do padrão de G6PD. Os resultados foram expressos como U/ μ g proteína.

4.2.5.5 Superóxido dismutase

A atividade da SOD foi realizada de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2.0 para pH 10.0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm. Em uma cubeta contendo 1,95 mL de glicina 50 mM, pH 10.2, foram adicionados 50 μ L de

adrenalina 60 mM (pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar, e então foi adicionada a alíquota da amostra, geralmente em torno de 20 a 50 μ L, dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota. Curvas de 3 ou 4 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD (USOD/g) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo.

4.2.5.6 Gama-Glutamil-Transferase

Após a incubação, as fatias foram homogeneizadas em tampão Tris 100 mM pH 8,5 e a atividade enzimática da GGT foi realizada através da seguinte reação: o grupo glutamyl, da γ -Glutamyl-p-Nitroanilida (substrato) é transferido pela GGT para a Glicilglicina (aceptor), com liberação de p-Nitroanilina, a qual é diazotada, gerando um composto final de cor rósea com uma absorbância que pode ser medida num comprimento de onda de 530 nm. Resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína.

4.2.5.7 Alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase

Após a incubação com os hormônios, as fatias de hipocampo foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e a atividade enzimática foi medida colorimetricamente. A alanina aminotransferase (ALT/TGP) catalisa especificamente a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. A aspartato aminotransferase (AST/TGO) catalisa especificamente a transferência do grupo amina do aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato. Tanto o piruvato quanto o oxaloacetato formado reagem com a 2-4-dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra, e é medida espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 505 nm. Os resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína.

4.2.6 Captação de Glicose

Para a determinação da captação de ^{14}C -2-deoxi-D-glicose (^{14}C -DG), fatias de hipocampo foram pré-incubadas a 37°C durante 15 min com tampão KRB, e incubadas durante 30 minutos com $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de ^{14}C -DG na presença ou ausência de $\text{T}_{3\text{r}}$ (10^{-9} M). Após a incubação, o tecido foi digerido com $\text{NaOH } 0,5\text{M}$. Alíquotas de $100 \mu\text{L}$ da amostra e do meio de incubação foram colocadas em líquido de cintilação e a radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida - LKB beta (modelo 1215, EG e G- Wallac , Turku , Finlândia). Os resultados foram expressos como relação tecido/meio em mg de glicose/mL/mg de proteína.

4.2.7 Concentração de Proteínas

A concentração de proteínas foi avaliada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Uma curva padrão utilizando a albumina de soro bovino (Sigma®) foi utilizada para calcular os níveis de proteína nas amostras.

4.2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações feitas em triplicata. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey-Kramer. Também foi utilizado para avaliação de algumas amostras o teste “t” de Student. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

5. RESULTADOS

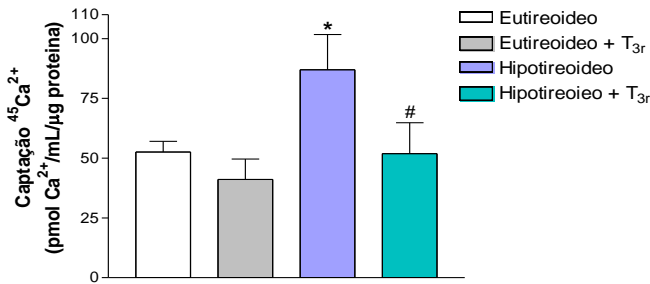
Neste trabalho foram utilizados modelos experimentais de tratamento *in vivo* (hipotireoidismo) e *in vitro* (incubação de fatias de hipocampo com HT). Ratas gestantes foram tratadas com PTU na água de beber desde o 8º dia gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. Animais eutireoideos foram utilizados como grupo controle. Aos 15 dias de idade, os filhotes foram eutanasiados e os hipocampus foram removidos, dissecados e fatiados. Os hipocampus dos animais eutireoideos e hipotireoideos foram incubados *in vitro* durante 30 min na presença ou ausência de T_3r 10^{-9} M, com o intuito de avaliar se este hormônio é capaz de reverter as alterações bioquímicas induzidas pelo hipotireoidismo congênito sobre as células neurais. Para tanto, foram determinados o influxo de $^{45}Ca^{++}$, os níveis de GSH e TBARS, assim como o dano oxidativo às proteínas e a atividade das enzimas GPx, GR, G6PD, CAT, SOD, e GGT, com ênfase na investigação do mecanismo de ação do T_3r sobre a atividade desta última enzima. Ainda, foi investigada a captação de $[^{14}C]$ -2-desoxiglicose e a atividade das enzimas AST e ALT, com o intuito de se compreender o possível papel dos HT no metabolismo energético.

Inicialmente, foi realizada uma curva de concentração-resposta com o T_3r , sobre o influxo de Ca^{++} e os níveis de GSH, utilizando-se concentrações crescentes do hormônio, desde 10^{-15} a 10^{-6} M. Os resultados mostraram que a concentração na qual o hormônio apresenta o efeito máximo foi a de 10^{-9} M (dados não mostrados). Também se determinou que o tempo ideal de exposição hormonal era de 30 minutos. Sendo assim, os experimentos subsequentes foram realizados com 30 min de exposição a 10^{-9} M de T_3r .

5.1 CAPTAÇÃO DE $^{45}Ca^{++}$

Para investigar o possível efeito do T_3r sobre o influxo de cálcio induzido pelo hipotireoidismo congênito em hipocampo de ratos imaturos, fatias de hipocampo foram expostas ao hormônio por 30 min. Os resultados demonstraram que o T_3r reverte o influxo de cálcio estimulado pelo hipotireoidismo congênito (Figura 13), sugerindo que este hormônio pode ter um efeito neuroprotetor frente ao fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica.

Figura 13 - Efeito do T_3r sobre a captação de $^{45}Ca^{++}$ em hipocampo de ratos imaturos.



Fatias de hipocampo foram expostas durante 30 minutos ao T_{3r} (10^{-9} M.). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. como pmol $^{45}Ca^{++}$ /mL/ μ g de proteína. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo eutireoideo ou ao grupo hipotireoideo foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: * $p < 0,01$ em relação ao grupo eutireoideo; # $p < 0,001$ em relação ao grupo hipotireoideo.

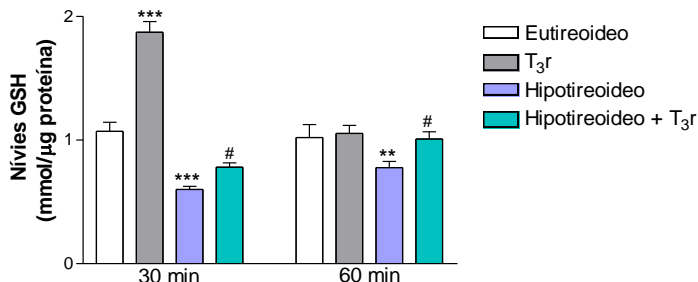
5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NO ESTRESSE OXIDATIVO

A indução do estresse oxidativo desencadeada pelo hipotireoidismo foi descrita previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Cattani *et al.*, 2013). Com o objetivo de investigar se o T_{3r} é capaz de reverter o estresse oxidativo induzido pelo hipotireoidismo congênito, foram determinados o conteúdo da GSH - o antioxidante não enzimático mais prevalente no cérebro -, os níveis de TBARS e o dano oxidativo a proteínas.

Os resultados demonstraram que os níveis de GSH diminuem significativamente em hipocampo de animais hipotireoideos; níveis estes, que podem ser restaurados pela exposição ao T_{3r} durante 30 ou 60 minutos (Figura 14). Além disso, o T_{3r} aumenta significativamente o conteúdo de GSH em hipocampo de ratos eutireoideos após 30 min de incubação. Entretanto, após 60 minutos de tratamento, o conteúdo deste antioxidante retorna a níveis basais. Estes dados sugerem um mecanismo de ação não genômico/rápido para este hormônio (independente da interação com receptores nucleares). Os estudos

posteriores foram realizados após 30 min de exposição ao T_3r na concentração de 10^{-9} M.

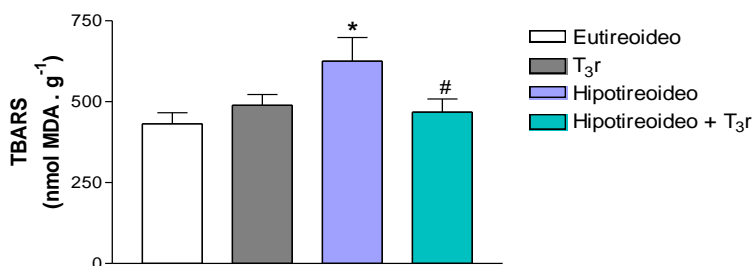
Figura 14 -Efeito do hipotireoidismo e do T_3r sobre os níveis de GSH em hipocampo de ratos imaturos.



Fatias de hipocampo de ratos eutireoideos e hipotireoideos foram incubadas na ausência ou presença de T_3r (10^{-9} M) por 30 ou 60 minutos. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo em mmol/ μ g de proteína. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo eutireoideo; # $P < 0,01$ comparado com grupo hipotireoideo.

A figura 15 mostra que o aumento nos níveis de TBARS induzido pelo hipotireoidismo congênito em hipocampo de ratos imaturos pode ser revertido pelo tratamento com T_3r por curtos períodos (30 min).

Figura 15 - Efeito do hipotireoidismo congênito e do T_3r sobre a peroxidação lipídica em hipocampo de ratos imaturos.

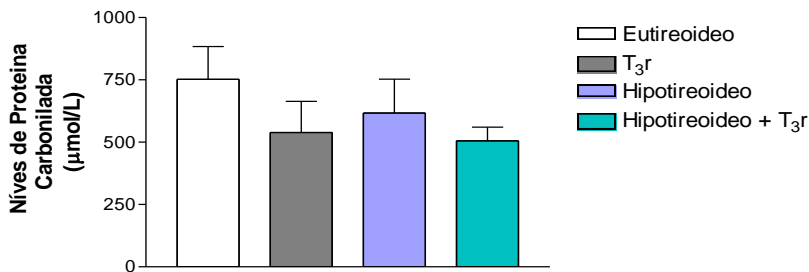


Fatias de hipocampo foram incubadas na presença ou ausência de T_3r (10^{-9} M) por 30 minutos. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06

animais de cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: $*p < 0,01$ comparado com o grupo eutireoideo; $\#P < 0,01$ comparado com grupo hipotireoideo.

Por outro lado, a carbonilação de proteínas não foi alterada pelo hipotireoidismo ou pela exposição ao T_3r (figura 16).

Figura 16 - Efeito do T_3r e do hipotireoidismo congênito sobre a carbonilação de proteínas.



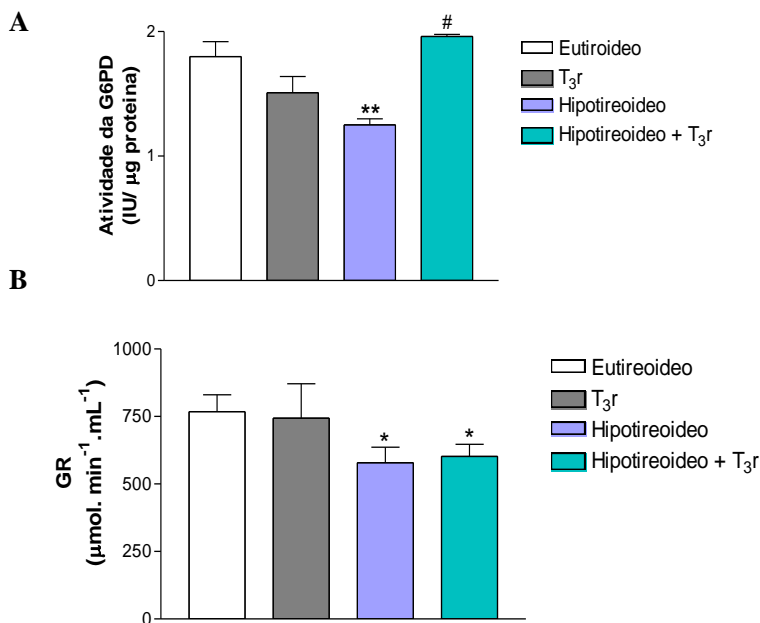
Fatias de hipocampo foram incubadas na presença ou ausência de T_3r (10^{-9} M) por 30 minutos. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais de cada grupo em $\mu\text{mol/L}$. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

Uma vez evidenciada a participação do T_3r como um agente protetor frente à excitotoxicidade e ao estresse oxidativo induzidos pelo hipotireoidismo congênito, capaz de reverter o influxo de cálcio, assim como a depleção dos níveis GSH e a oxidação de lipídios, foi investigado o efeito deste hormônio sobre o sistema de defesa antioxidante enzimático em hipocampo de ratos imaturos eutireoideos e submetidos ao modelo de hipotireoidismo congênito.

O hipotireoidismo reduz a atividade da GR e da G6PD em hipocampo de ratos imaturos e o T_3r é capaz de reverter a inibição da atividade da G6PD (Figura 17A), mas não da GR (Figura 17B). Por outro lado, o T_3r diminui a atividade da GPx tanto em hipocampo de ratos eutireoideos quanto hipotireoideos (Figura 18). Além disso, tanto o hipotireoidismo quanto a exposição ao T_3r não foram capazes de alterar

a atividade da catalase em hipocampo de ratos de 15 dias de idade (Figura 19).

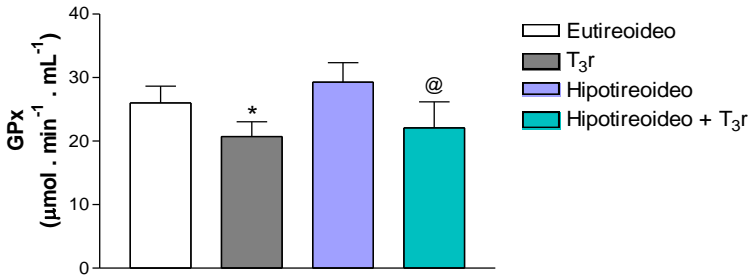
Figura 17- Efeito do hipotireoidismo congênito e do T_3r sobre a atividade da G6PD (A) e da GR (B) em hipocampo de ratos imaturos.



Fatias de hipocampo foram incubadas na presença ou ausência de T_3r ($10^{-9}M$) por 30 minutos. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$ comparado com o grupo eutireoideo; # $p < 0,01$ comparado com grupo hipotireoideo.

Considerando-se que a inibição da GR e da G6PD podem estar contribuindo para a diminuição dos níveis de GSH observados no hipotireoidismo, foi investigado a atividade da GPx com o intuito de estudar o perfil de atividade das enzimas envolvidas no metabolismo da GSH. Os resultados mostraram que o hipotireoidismo não altera a atividade da GPx, enzima envolvida na conversão do H_2O_2 a H_2O às custas da oxidação da GSH. Por outro lado, o T_3r reduziu a atividade da GPx tanto em hipocampo de ratos eutireoideos quanto hipotireoideos (Figura18).

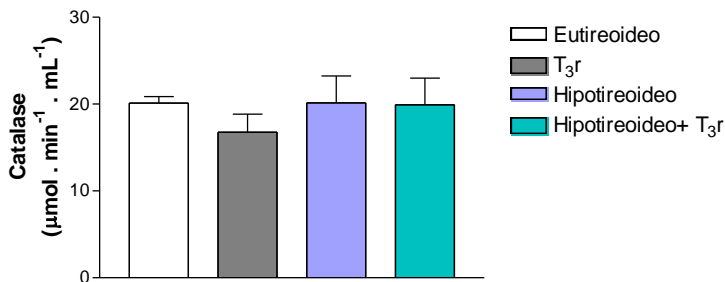
Figura 18 - Efeito do hipotireoidismo congênito e do T_3r sobre a atividade da GPx em hipocampo de ratos imaturos.



Fatias de hipocampo foram incubadas na presença ou ausência de T_3r (10^{-9}M) por 30 minutos. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: * $p < 0,01$ comparado com o grupo eutireoideo; @ $P < 0,01$ comparado com grupo hipotireoideo.

A Figura 19 mostra que a atividade da CAT não é alterada pelo hipotireoidismo congênito nem pela exposição ao T_3r em hipocampo de ratos de 15 dias de idade.

Figura 19- Efeito do hipotireoidismo congênito e do T_3r sobre a atividade da catalase em hipocampo de ratos imaturos.

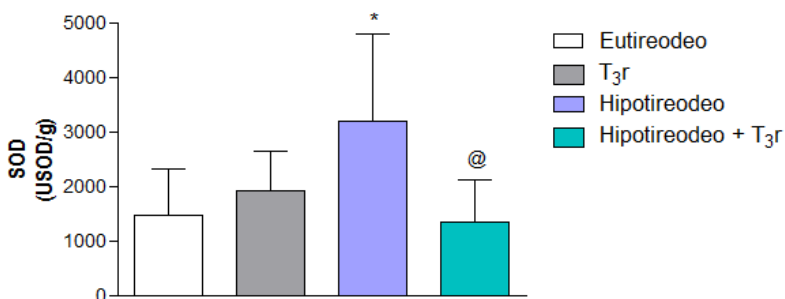


Fatias de hipocampo foram incubadas na presença ou ausência de T_3r (10^{-9}M) por 30 minutos. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08

animais de cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

A indução da atividade da SOD, que catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ observada em hipocampo de ratos hipotireoideos pode estar induzindo a formação de altos níveis H_2O_2 no cérebro destes animais. A incubação por 30 min com T_3r apresentou efeito potencialmente protetor frente ao modelo de hipotireoidismo congênito, considerando-se que o hormônio diminuiu a atividade enzimática para valores semelhantes aos observados nos animais eutireoideos (figura 20). Em conjunto, estes resultados ressaltam a relevância do T_3r como hormônio ativo e não como metabólito inativo.

Figura 20 - Efeito do hipotireoidismo congênito e do T_3r sobre a atividade da SOD em hipocampo de ratos imaturos.



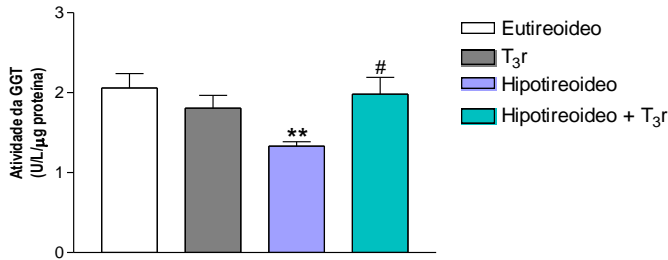
Fatias de hipocampo foram incubadas com ou sem T_3r por 30 minutos. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: * $p < 0,05$ comparado com o grupo eutireoideo; @ $P < 0,05$ comparado com grupo hipotireoideo.

Considerando-se que a GGT é uma enzima passo-limitante para o “turnover” da GSH, investigou-se o efeito do hipotireoidismo, assim como da suplementação com T_3r sobre a atividade desta enzima em hipocampo de ratos imaturos. Os resultados mostraram que assim como ocorre com os níveis de GSH, a atividade desta enzima foi inibida pelo hipotireoidismo e este efeito foi revertido pelo T_3r (Figura 21A). Com o intuito de investigar a seletividade do T_3r neste efeito, as fatias de

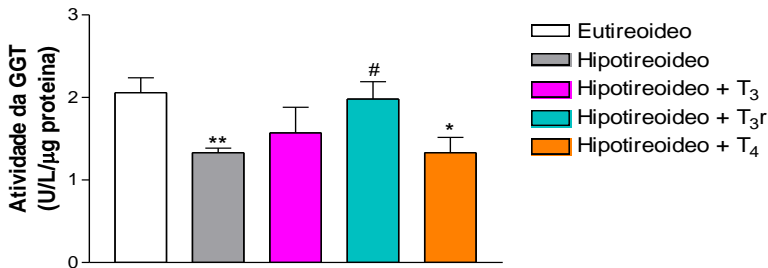
hipocampo foram incubadas com T_3 , T_4 ou T_{3r} . A figura 21B demonstra que o efeito do hipotireoidismo congênito é parcialmente alterado pelo T_3 , inalterado pelo T_4 e revertido totalmente pelo T_{3r} , reforçando a especificidade deste hormônio em prevenir os danos oxidativos provocados pela deficiência de HT.

Figura 21- Efeito do hipotireoidismo congênito e do T_{3r} sobre a atividade da gama-glutamil transferase em hipocampo de ratos imaturos.

A



B



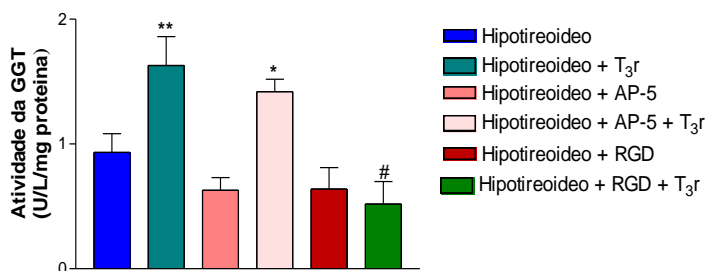
Fatias de hipocampo foram incubadas na presença ou ausência de T_{3r} $10^{-9}M$, por 30 minutos (A). As fatias foram incubadas na presença ou ausência dos HT: T_3 ($10^{-7}M$), T_4 ($10^{-9}M$) e T_{3r} ($10^{-9}M$) (B). Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: * p < 0,05; ** p < 0,001 comparado com o grupo eutireoideo; # P < 0,01 comparado com grupo hipotireoideo.

5.3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO DO T_{3r} SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GGT

Considerando-se que as alterações nas atividades das enzimas antioxidantes podem estar relacionadas com danos oxidativos, e que os HT podem reverter estes danos restaurando a atividade de algumas enzimas, os mecanismos envolvidos na ação do T_3r sobre o reestabelecimento da atividade enzimática da GGT foram estudados. Para isto, foi investigado o envolvimento das vias da PKA, PKC, CaMKII, MAPKp38, do receptor glutamatérgico do tipo NMDA e do receptor de integrina $\alpha\beta3$.

Com o intuito de verificar se o mecanismo de ação do T_3r envolve a modulação dos receptores do tipo NMDA para glutamato e/ou o receptor de integrina $\alpha\beta3$, fatias de hipocampo de ratos hipotireoideos foram expostas durante a pré-incubação e incubação aos antagonistas destes receptores (AP-5 ou o peptídeo RGD, respectivamente). Os resultados mostraram que o AP-5 não altera o efeito do T_3r sobre a atividade da GGT, enquanto que o peptídeo RGD previne a ação hormonal (Figura 22). Estes dados demonstram uma ação não genômica do T_3r através de mecanismos envolvendo a ativação do receptor de superfície integrina $\alpha\beta3$ em hipocampo de ratos imaturos.

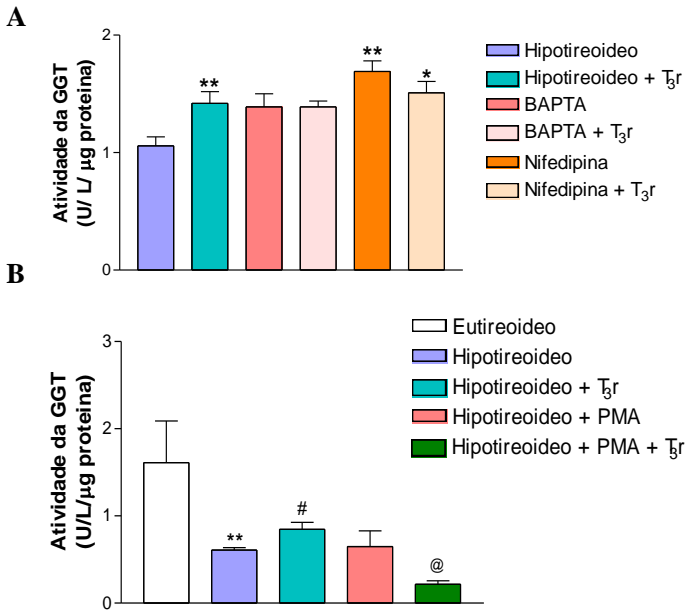
Figura 22- Envolvimento dos receptores de membrana do tipo NMDA e da integrina $\alpha\beta3$ no mecanismo de ação do T_3r sobre a atividade da GGT em hipocampo de ratos imaturos.



Fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência dos antagonistas AP-5 (10 μ M) ou peptídeo RGD (500 nM) e incubados por 30 min com ou sem T_3r 10^{-9} M. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ comparados com o grupo hipotireoideo; # $p < 0,01$ comparado com grupo hipotireoideo + T_3r .

A Figura 23A mostra que a redução dos níveis intracelulares de cálcio através do uso de BAPTA-AM (quelante de cálcio intracelular) ou da nifedipina (bloqueador de CCDV do tipo-L) estimula a atividade da GGT, semelhantemente a ação do T_3r sobre esta enzima. Estes resultados estão de acordo com a ação inibitória clássica do cálcio sobre a atividade enzimática da GGT (MERONI *et. al.*, 1997). Considerando-se a relevância do cálcio nos mecanismos de sinalização celular envolvendo a PKC, utilizou-se o acetato de forbol-miristoil (PMA) como ativador desta cinase com o intuito de verificar a participação desta enzima no mecanismo de ação hormonal. Os resultados mostraram que o PMA não altera a atividade da GGT em hipocampo de ratos hipotireoideos; entretanto, a associação de PMA com T_3r impede o efeito deste hormônio sobre a estimulação da GGT (Figura 23B).

Figura 23- Envolvimento do cálcio e da PKC no mecanismo de ação do T_3r sobre a atividade da GGT em hipocampo de ratos imaturos.

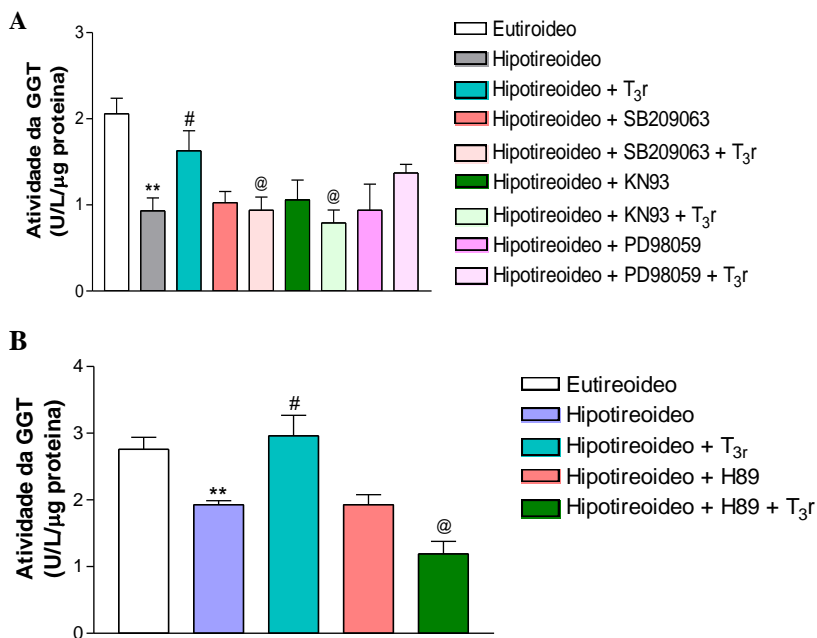


Fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de 50 μ M BAPTA-AM ou 10 μ M nifedipina (A), ou 1 μ M PMA (B) e incubados por 30 min com ou sem T_3r (10^{-9} M). Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: ** p

<0,001 comparado com o grupo eutireoideo; #P<0,01 comparado com grupo hipotireoideo; @p<0,01 comparado com o grupo hipotireoideo + T₃r.

A figura 24 mostra o envolvimento das proteínas cinases p38, CaMKII, ERK e PKA no mecanismo de ação do T₃r sobre a atividade da GGT. A exposição das fatias de hipocampo durante os períodos de pré-incubação e incubação aos inibidores das vias da CaMKII, ERK e PKA (KN93, PD98059 e H89, respectivamente) preveniu o efeito do T₃r sobre a atividade da GGT, sugerindo o envolvimento destas rotas de sinalização celular no mecanismo de ação hormonal capaz de reverter a inibição enzimática induzida pelo hipotireoidismo congênito.

Figura 24- Participação de proteínas cinases no mecanismo de ação do T₃r sobre a atividade da GGT em hipocampo de ratos imaturos.



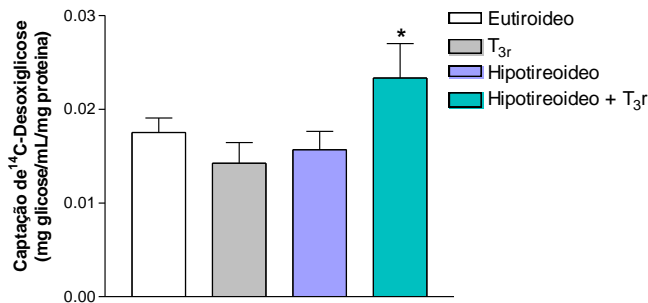
Fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de inibidores das proteínas cinases p38, CaMKII, ERK (A) e PKA (B) (10 μM SB239063, 10 μM KN-93, 10 μM PD98059 ou 10 μM H89,

respectivamente) e incubados por 30 min com ou sem T_{3r} (10^{-9} M) na presença ou não dos inibidores descritos. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: $^{**}p < 0,001$ comparado com o grupo eutireoideo; $\#P < 0,01$ comparado com grupo hipotireoideo; $^@p < 0,01$ comparado com o grupo hipotireoideo + T_{3r} .

5.4 CAPTAÇÃO DE GLICOSE

Para determinar o efeito do T_{3r} sobre a captação de ^{14}C -DG em hipocampo de ratos hipotireoideos, fatias de tecido foram incubadas com $0,1 \mu Ci$ de ^{14}C -DG durante 30 minutos na presença ou ausência do hormônio T_{3r} , na concentração de 10^{-9} M. Os resultados mostraram que o hipotireoidismo congênito não afeta a captação de ^{14}C -DG em hipocampo de ratos imaturos. Entretanto o T_{3r} é capaz de estimular a entrada de glicose em hipocampo de ratos hipotireoideos sem alterar este parâmetro no hipocampo de ratos eutireoideos (Figura 25). Estes dados sugerem que a deficiência dos HT leva a uma maior suscetibilidade as ações do T_{3r} em hipocampo de ratos imaturos.

Figura 25- Efeito do T_{3r} sobre a captação de ^{14}C -2-desoxi-D-glicose no hipocampo de animais hipotireoideos.

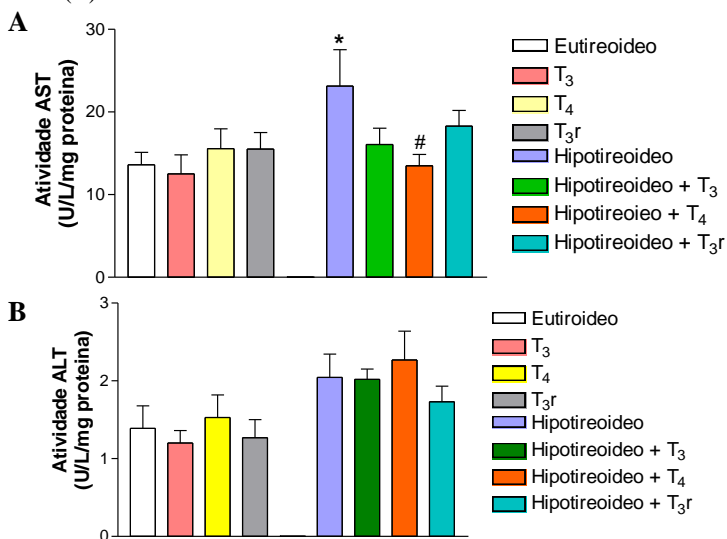


Fatias de hipocampo foram incubadas com $0,1 \mu Ci$ de ^{14}C -2-DG na presença ou ausência de T_{3r} (10^{-9} M) durante 30 min. Diferenças estatisticamente significativa em relação do controle, foram determinadas através teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: $^{*}p < 0,01$ em relação ao grupo hipotireoideo.

5.5 EFEITO DO HIPOTIREOIDISMO E DO T_3 SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS AST/ALT

A atividade das enzimas AST/ALT foi investigada em fatias de hipocampo de animais hipotireoideos, tratadas com os HT: T_3 (10^{-7} M), T_4 (10^{-9} M) e T_3r (10^{-9} M). A determinação das atividades das aminotransferases foi utilizada com o intuito principal de esclarecer se o hormônio T_3 é capaz de alterar a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do glutamato que participam do metabolismo energético em hipocampo de animais hipotireoideos. Os resultados demonstraram que o hipotireoidismo aumenta significativamente a atividade da AST, ação que pode ser revertida pelo hormônio T_4 , mas não é alterada nem pelo T_3 , nem mesmo pelo T_3r (Figuras 26A). Por outro lado, observou-se indução na atividade da ALT no hipocampo dos animais hipotireoideos em relação aos eutireoideos. Entretanto, esse efeito não foi revertido pela exposição a nenhum dos HT testados (Figura 26B).

Figura 26- Efeito dos HT T_3 , T_4 e T_3r sobre a atividade das enzimas AST (A) e ALT (B).



Fatias do hipocampo foram expostas durante 30 minutos na presença ou ausência dos HT: T_3 (10^{-7} M), T_4 (10^{-9} M) e T_3r (10^{-9} M).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram investigadas as possíveis ações não genômicas dos HT, com foco principal no hormônio T_{3r} , sobre o hipocampo de ratos hipotireoideos, com o intuito de desvendar, pelo menos alguns dos mecanismos envolvidos na atividade deste hormônio como um possível agente neuroprotetor. Em suma, investigou-se a capacidade do T_{3r} em reverter algumas das disfunções bioquímicas decorrentes da diminuição dos níveis hormonais, como: o aumento do influxo de Ca^{++} ; a desregulação do sistema antioxidante; e alterações no metabolismo energético.

Ações não genômicas para os HT têm sido amplamente descritas (DAVIS; DAVIS; COBIS, 2005; ZAMONER *et al.*, 2006a, 2007a, 2008a, ZAMONER; PESSOA-PUREUR, 2011; ZANATTA *et al.*, 2013). Entretanto, o mecanismo não clássico também pode conectar-se a eventos de sinalização nuclear, através de uma ou mais vias de transdução de sinal. Importantes estudos mostram que o efeito do T_{3r} é semelhante ao efeito do T_4 na regulação não-genômica da atividade da desidrase D2 e na organização dos microfilamentos em astrócitos e neurônios (LEONARD; FARWELL, 1997; FARWELL *et al.*, 2005). Estes trabalhos apontam a similaridade entre o T_4 e o T_{3r} nas ações não-genômicas que, em conjunto com relatos de que o T_{3r} é a iodotironina mais abundante durante a vida fetal (ROTI *et al.*, 1982), poderiam justificar a ação deste metabólito no hipocampo de ratos imaturos.

Em um estudo recente de nosso grupo de pesquisa (CATTANI *et al.*, 2013), foi demonstrado que o hipotireoidismo congênito diminui a captação de glutamato nos astrócitos devido a diminuição nos níveis dos transportadores glutamatérgicos astrogliais (GLAST e GLT-1). Níveis aumentados de glutamato na fenda sináptica acarretam no aumento no influxo de Ca^{++} , provavelmente através da hiperestimulação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, induzindo o fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica.

No presente estudo, demonstrou-se que o aumento no influxo de Ca^{++} , previamente demonstrado no hipocampo de ratos submetidos hipotireoidismo congênito (CATTANI *et al.*, 2013), pode ser revertido pela exposição *in vitro* das fatias de tecido ao hormônio T_{3r} (10^{-9} M). Desta maneira, sugerimos que o T_{3r} possa exercer um efeito protetor no hipocampo, diminuindo o influxo excessivo de Ca^{++} e, conseqüentemente a excitotoxicidade glutamatérgica decorrente do hipotireoidismo congênito. Corroborando estes resultados, Murphy e

colaboradores (1992) demonstraram que o T_3 (10 nM), considerado o hormônio biologicamente ativo, é capaz de inibir a captação de Ca^{++} *in vivo* na porção mitocondrial do fígado de animais hipotireoideos, sugerindo assim, que o T_3 pode regular o transporte mitocondrial de Ca^{++} .

Estudos pioneiros, investigando as ações não genômicas dos hormônios T_3 e T_4 , demonstraram que estes hormônios induzem o influxo de Ca^{++} via estímulos rápidos e independentes da síntese proteica (SEGAL; INGBAR, 1989; SEGAL, 1990). Neste contexto, nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que tanto o T_3 quanto o T_4 induzem o influxo de Ca^{++} em fatias de córtex cerebral de ratos em desenvolvimento (ZAMONER *et al.*, 2007a). Além disso, Zanatta e colaboradores (2013) demonstraram que o T_{3r} (10^{-17} M) estimulou a captação de Ca^{++} em células de Sertoli de ratos eutireoideos com 11 dias de idade após 60 segundos de exposição ao hormônio. O presente estudo consiste na primeira demonstração de ações do T_{3r} como modulador do influxo de Ca^{++} em células neurais. Sendo assim, pode-se atribuir que os mecanismos envolvidos na modulação do influxo de Ca^{++} por HT depende do tipo celular, do hormônio e do estado fisiopatológico.

Avaliando outros possíveis efeitos neuroprotetores do T_{3r} , além da diminuição no influxo de Ca^{++} , investigamos a capacidade deste hormônio em reverter os parâmetros de estresse oxidativo observados no hipocampo de animais com hipotireoidismo congênito. Os resultados mostraram que o tratamento *in vitro* com T_{3r} (10^{-9} M) é capaz de restaurar os níveis de GSH, que são depletados pelo hipotireoidismo. Este tripeptídeo exerce um papel antioxidante extremamente importante no cérebro, sendo considerado o principal antioxidante intracelular, essencial na defesa contra ERO (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Estudos prévios descreveram o hipotireoidismo como um indutor do estresse oxidativo, em que uma das primeiras manifestações observadas foi a depleção dos níveis de GSH (RAHAMAN *et al.*, 2001).

Considerando-se que o efeito do T_{3r} sobre os níveis de GSH ocorreu após curtos períodos de incubação com o hormônio (30 ou 60 minutos), nossos dados sugerem que o mecanismo de ação hormonal envolve a modulação de vias não genômicas, independentes da síntese proteica. Neste contexto, Das e colaboradores (2004) demonstraram que o tratamento *in vivo* com T_3 (20µg/100g) durante 3 dias foi capaz de reverter a depleção nos níveis da GSH causada pelo hipotireoidismo no córtex de animais hipotireoideos com 90 dias de idade. Além disso, Dasgupta e colaboradores (2007) observaram que tanto no cérebro de

animais hipotireoideos quanto nos astrócitos em cultura, o T_3 (100 nM) foi capaz de restaurar a depleção dos níveis de GSH. Os autores sugerem que os HT modulam positivamente a atividade da enzima glutamato-cisteína ligase, etapa limitante na biossíntese da GSH. Cabe salientar que o estudo de Das e colaboradores (2004) bem como o de Dasgupta e colegas (2007) apontam a importância no T_3 , o hormônio considerado biologicamente ativo quanto a modulação da expressão gênica, revertendo o estresse oxidativo induzido pelo hipotireoidismo via mecanismos genômicos. Entretanto, nenhum estudo prévio envolvendo o sistema de defesas antioxidante foi realizado utilizando-se o hormônio T_{3r} .

Além da depleção nos níveis de GSH, o hipotireoidismo induz peroxidação lipídica, conforme demonstrado pelo aumento nos níveis de TBARS. Este processo pode comprometer a integridade das membranas celulares, bem como alterar diversas funções fisiológicas, contribuindo significativamente para o desenvolvimento das disfunções neurais clássicas do hipotireoidismo. Neste contexto, o T_{3r} (10^{-9} M) foi capaz de reverter a peroxidação lipídica induzida pelo hipotireoidismo. Estes resultados estão de acordo com Das e colaboradores (2004), os quais demonstraram que o T_3 também foi capaz de reduzir a lipoperoxidação em córtex cerebral de animais hipotireoideos com 90 dias de idade.

O efeito protetor dos HT frente ao estresse oxidativo também foi estudado por Pan e colaboradores (2012), os quais demonstraram que o tratamento com T_4 (0,02 µg/g) durante 28 dias, foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica em hipocampo de ratas fêmeas com 3 meses de idade; contudo, a suplementação com a vitamina E associada ao T_4 , pelo mesmo período, diminuiu significativamente a peroxidação lipídica em comparação com o tratamento apenas com T_4 . Estes dados demonstram a relevância da suplementação com antioxidantes em associação com o hormônio para reverter os efeitos do hipotireoidismo, sugerindo perspectivas futuras de estudos com o T_{3r} em associação com substâncias antioxidantes.

Apesar do hipotireoidismo congênito depletar os níveis de GSH e causar peroxidação lipídica, nossos resultados mostraram que esta disfunção tireoidiana não é capaz de induzir a carbonilação de proteínas em hipocampo de ratos em desenvolvimento, bem como o tratamento das fatias de hipocampo desses animais com T_{3r} (10^{-9} M) não provoca nenhuma alteração significativa neste parâmetro. Das e colaboradores (2004) também não observaram mudança significativa no conteúdo de carbonilação proteica em fração mitocondrial de fígado de ratos

hipotireoideos com 90 dias de idade. Por outro lado, o tratamento *in vivo* com T₃ (20 µg/100g) promoveu um aumento na carbonilação de proteínas. Neste contexto, foi descrito que o hipertireoidismo causa glicação e oxidação de proteínas no fígado (PAMPLONA *et al.*, 1999).

A indução na geração de ERO em ratos neonatos e adultos devido a alterações na função da tireoide tem sido relatada por diversos grupos de pesquisa (VENDITTI *et al.*, 1997; RAHAMAN *et al.*, 2001; YILMAZ *et al.*, 2003; ZAMONER *et al.*, 2007c, 2008a; CATTANI *et al.*, 2013). Alterações nas concentrações plasmáticas dos HT podem induzir mudanças no sistema de defesa antioxidante em vários tecidos, inclusive o cérebro (DAS *et al.*, 2001; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007; CATTANI *et al.*, 2013). Salienta-se que os HT são importantes moduladores do consumo de oxigênio celular com consequente geração de ERO em vários tecidos (DAS *et al.*, 2004; DASGUPTA *et al.*, 2007; BHANJA *et al.*, 2010).

As ERO são capazes de oxidar muitos compostos celulares incluindo DNA, RNA, lipídios de membranas e proteínas, levando a danos celulares. Como uma forma de defesa primária contra ERO, os organismos têm desenvolvido sistemas de defesa antioxidante para proteger as células contra estes danos. As enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante e reguladoras do metabolismo como G6PD, GR, GPx, SOD, CAT e GGT podem proteger a célula de efeitos deletérios de radicais livres. Já é bem estabelecido na literatura que o hipotireoidismo altera o status destas enzimas (YLMAZ *et al.*, 2003; DAS *et al.*, 2004; ZAMONER *et al.*, 2008a; AHAMED *et al.*, 2012; CATTANI, *et al.*, 2013) e o tratamento dos animais hipotireoideos com os HT (T₃ e T₄) foi capaz de reverter a diminuição da atividade dessas enzimas em diferentes tecidos (DAS *et al.*, 2001, 2004; DASGUPTA *et al.*, 2005, 2007; PAN *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostraram que a diminuição nos níveis de GSH é acompanhada pela inibição na atividade da GR e da G6PD em hipocampo de ratos hipotireoideos. A exposição de fatias de hipocampo de animais hipotireoideos ao T_{3r} (10⁻⁹ M), durante 30 min, não foi capaz de reverter a inibição da atividade da GR; porém, estimulou significativamente a atividade da G6PD. Esta última enzima participa da via das pentoses-fosfato gerando NADPH, que por sua vez, atua como doador de elétrons na redução da GSSG em GSH, que é catalisada pela GR. Níveis elevados de NADPH, devido ao estímulo da atividade da G6PD pelo tratamento com T_{3r}, também podem estar envolvidos na modulação de mecanismos redox, em que os elétrons são transferidos

através de um gradiente de potencial de espécies reduzidas para as oxidadas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Essas transferências de elétrons são requeridas para diminuir o potencial oxidativo de diversos componentes celulares, como no sistema microssomal dos citocromos P450, assim como nas biossínteses redutoras

Resultados similares ao encontrado neste estudo foram demonstrados por Das e colaboradores (2004), em que o hipotireoidismo resultou em uma diminuição tanto nos níveis da GSSG quanto na atividade da GR na fração pós mitocondrial do cérebro de ratos adultos. Estes parâmetros não foram alterados pelo tratamento com T_3 . Neste contexto, sugere-se que o T_3r , assim como o T_3 , podem atuar como protetores frente ao estresse oxidativo induzido pelo hipotireoidismo congênito, visto que aumentam os níveis de GSH, embora por mecanismos independentes da atividade GR.

A SOD é considerada uma enzima que participa da primeira linha de defesa das células contra ERO. Esta enzima catalisa a dismutação do anion $O_2^{\bullet-}$ à H_2O_2 e água. Apesar dessas espécies produzidas ($O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2) serem pouco reativas, podem reagir com metais de transição (por exemplo, ferro e cobre), gerando via reação de Fenton, o $\bullet OH$, (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006), o qual é extremamente reativo e deletério para as células. Sendo assim, o H_2O_2 gerado é removido por outras enzimas antioxidantes como a CAT, que promove a decomposição direta de H_2O_2 à água e oxigênio; e a GPx, uma enzima antioxidante tiol-específica, que decompõe peróxidos inorgânicos e orgânicos, como o H_2O_2 , utilizando a GSH como doadora de elétrons (TUNÇMEN; TUZMEN, 2007). O aumento na atividade da SOD, observado no hipotireoidismo pode levar a elevados níveis de H_2O_2 e, conseqüentemente, induzir estresse oxidativo. Por outro lado, o tratamento com T_3r restaura a atividade da SOD para valores próximos aos observados no controle. Além disso, nossos resultados mostraram que a atividade da CAT não é alterada pelo hipotireoidismo bem como pelo tratamento com o hormônio T_3r . Entretanto, o T_3r diminuiu a atividade da GPx, tanto no hipocampo de animais eutiroides quanto de animais hipotireoides. Analisando os resultados em conjunto, a diminuição da atividade da SOD para níveis basais, devido ao tratamento com T_3r , sugere que este hormônio pode diminuir a geração de H_2O_2 . Esta hipótese está de acordo com diminuição na atividade da GPx induzida pelo T_3r , visto que esta enzima também é responsável por detoxificar o H_2O_2 .

Considerando-se que foram observadas alterações na atividade das enzimas antioxidantes e depleção dos níveis da GSH em hipocampo de ratos hipotireoideos, bem como que a exposição ao T_3r é capaz de alterar o perfil oxidativo neste tecido, investigou-se o efeito deste hormônio sobre atividade da GGT. Esta é a única enzima de membrana plasmática capaz de iniciar a metabolização da GSH extracelular, via remoção do resíduo gama-glutamil deste tripeptídeo, levando a formação de um sulfidrildipeptídeo, a cisteinil-glicina (cys-gly). Esta cys-gly gerada pode ser clivada por dipeptidases de membrana e os aminoácidos gerados podem ser reabsorvidos pela célula, ou o próprio dipeptídeo cys-gly é levado para o ambiente extracelular, onde juntamente com os aminoácidos serão utilizados para a síntese *de novo* de GSH ou de proteínas (DROZDZ *et al.*, 1988; KUMAR *et al.*, 2000). Desta forma, a GGT participa na manutenção do estado redox das células (MARES *et al.*, 2005).

Dasgupta e colaboradores (2005), descreveram que os HT estimulam a atividade da GGT no cérebro de ratos em desenvolvimento, aumentando assim a quebra da GSH secretada pelas células astrogliais. Este evento é essencial para a síntese e homeostase da GSH nos neurônios. Os autores demonstraram que o hipotireoidismo diminui a atividade da GGT em cultura primária de astrócitos e o tratamento destas culturas com T_3 (10 nM) é capaz de reverter este declínio na atividade da GGT. O grupo sugeriu também, que o hipotireoidismo diminui a atividade da GGT *in vivo* no cérebro de animais com 15 dias de idade e a injeção intraperitoneal de T_3 (200 µg/100g), reverte esta atividade. Estes resultados corroboram nossos achados, visto que observamos uma diminuição significativa na atividade da GGT no hipocampo de ratos submetidos ao modelo experimental de hipotireoidismo. Além disso, o tratamento das fatias de hipocampo com T_3r (10^{-9} M) por 30 min foi capaz de restaurar a atividade da enzima.

Com o intuito de investigar as possíveis rotas de sinalização celular envolvidas no mecanismo pelo qual o T_3r reestabelece a atividade da GGT em hipocampo de ratos hipotireoideos, foram utilizadas algumas abordagens farmacológicas. Dentre estas abordagens, destaca-se o uso de inibidores enzimáticos, bloqueadores de canais iônicos, quelante de cálcio intracelular, bem como antagonistas de receptores, na presença ou ausência do hormônio. Cabe salientar que Farwell e colaboradores (1995), sugeriram que uma integrina poderia atuar como o receptor de superfície para os HT. Posteriormente, em 2005, Bergh *et al.* descreveram este receptor como sendo o dímero de

integrina $\alpha\beta 3$, presente na membrana plasmática de fibroblastos. A interação dos HT com este receptor de membrana pode ser prevenida através da utilização do peptídeo RGD, que é um ligante para a maioria das integrinas αv (VINATIER, 1995; KUMAR, 1998).

Na última década, vários grupos de pesquisa demonstraram que os HT exercem importantes efeitos não genômicos (BASSET *et al.*, 2003; DAVIS *et al.*, 2005), envolvendo a modulação dos canais de Na^+ , K^+ e Ca^{++} e a ativação de diversos tipos de proteínas cinases como ERK/MAPK via integrina $\alpha\beta 3$ (BERGH *et al.*, 2005). Porém, outras importantes ações não genômicas dos HT podem estar relacionadas com o sistema glutamatérgico, uma vez que estes hormônios são capazes de modular a subunidade NMDA dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos no hipocampo (LOSI *et al.*, 2008).

Desta maneira, avaliamos a participação do dímero de integrina $\alpha\beta 3$ como o receptor de superfície celular para o T_3r causando a restauração da atividade da GGT. Como pode ser observado na figura 22, o RGD preveniu a ação do T_3r sobre a atividade da GGT, sugerindo assim, que a modulação da atividade desta enzima pode ser dependente da interação deste hormônio com o receptor de integrina $\alpha\beta 3$. Estes resultados estão de acordo com os de Zanatta e colaboradores (2013), demonstrando que o efeito do T_3r sobre o influxo de Ca^{++} em testículos de ratos com 11 dias de idade pode ser prevenido pelo peptídeo RGD.

Nossos resultados também evidenciaram que o efeito do T_3r sobre a atividade da GGT é dependente da ativação das vias de sinalização celular da p38, ERK, CaMKII, e PKA, mas independente da ativação de PKC e do influxo de Ca^{++} (figura 23). Neste contexto, Meroni e colaboradores (1997) sugerem a existência de uma via inibitória dependente de Ca^{++} -calmodulina participando da regulação da atividade basal da GGT. Corroborando o efeito inibitório do Ca^{++} sobre a atividade desta enzima também em células hipocâmpais, nossos resultados mostraram que na presença de um bloqueador de CCDV-L (nifedipina) ou de um quelante de Ca^{++} intracelular (BAPTA-AM), observa-se o aumento na atividade da GGT tanto na presença quanto na ausência do T_3r . Estes dados sugerem que a diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{++} , provocada por T_3r , acarreta em menor disponibilidade deste íon para se ligar a calmodulina, que atua de forma inibitória sobre a atividade da GGT. Consequentemente, a diminuição do Ca^{++} intracelular induzida pelo hormônio ou através de ferramentas farmacológicas (nifedipina e BAPTA-AM), leva a desativação da via inibitória dependente deste íon sobre a atividade da

GGT. Dessa forma, o T_{3r} bloqueia o influxo de Ca^{++} exercendo um efeito protetor frente à excitotoxicidade glutamatérgica e ainda, retirando a inibição que este íon exerce sobre a atividade da GGT. Em conjunto estes dados reforçam a potencial atividade neuroprotetora deste hormônio.

Os resultados mostrando que o T_{3r} diminui o influxo de Ca^{++} corroboram o não envolvimento da PKC no mecanismo de ação deste hormônio sobre o hipocampo de ratos hipotireoideos, considerando-se que a ativação da PKC clássica está diretamente relacionada a modificações nos níveis intracelulares de Ca^{++} . Além disso, Losi *et al.* (2008) também demonstraram que tanto a inibição quanto o estímulo da atividade da PKC não afetam a modulação do T_3 sobre a ativação dos receptores do tipo NMDA, sugerindo desta maneira que esta cinase não está envolvida no mecanismo de ação dos HT sobre neurônios hipocampais.

Os membros da família das MAPK, já foram descritos como moduladores da atividade dos HT, sendo que estes membros têm diferentes papéis dependendo do tipo celular. Ishisaki e colaboradores (2004) sugeriram que a p38 MAPK está envolvida no estímulo do T_3 para a síntese de osteocalcina nas células de osteoblasto MC3T3-E1. Por outro lado, Lei *et al.* (2008) descreveram que a ativação da MAPK/ERK-1/2 pelo T_3 é necessária para a indução da atividade da $Na^+-K^+-ATPase$ em células alveolares epiteliais. Este mesmo grupo já havia demonstrado (LEI *et al.*, 2003), que o T_4 estimula rapidamente a fosforilação da tirosina e a translocação nuclear da ERK1/2 em células HELA e CV-1. Por outro lado, Gerges *et al.* (2004), sugeriram que o hipotireoidismo é responsável por diminuir parcialmente a fosforilação da ERK1/2 na região CA1 do hipocampo, e esta diminuição talvez possa contribuir para o atraso da potenciação de longa duração (LTP) observado no hipotireoidismo. Nossos resultados também mostraram a participação das vias da MAPK p38 e ERK1/2 na restauração da atividade da GGT pela ação do T_{3r} , em fatias do hipocampo (figura 24). Sugerimos desta maneira, que a ação das MAPK ERK1/2 e p38 no hipocampo de ratos hipotireoideos imaturos pode ter um efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo, dependente da interação do T_{3r} com a integrina $\alpha\beta_3$ (figura 12).

Alguns estudos sugerem ainda, que a relação entre deficiências de aprendizagem e memória geralmente descritas no hipotireoidismo, têm o envolvimento da via CaMKII na mediação de processos como a plasticidade sináptica (JOUVENCEAU *et al.*, 2006; MIYAMOTO *et*

al., 2006; VALLORTIGARA *et al.*, 2008). Vallortigara e colaboradores (2008), relacionaram que o aumento significativo da CaMKII em animais hipotireoideos adultos tratados com injeções subcutâneas de T₃ (150µg/Kg), com as mudanças comportamentais observadas nestes animais. Um dos importantes efeitos do hipotireoidismo no hipocampo é atribuído à redução da atividade e dos níveis totais da CaMKII na região CA1, ocasionando uma deficiência na expressão do LTP (GERGES *et al.*, 2005). Nossos resultados demonstraram que a ligação do T_{3r} com o receptor de integrina $\alpha\beta 3$ em células do hipocampo, é capaz de ativar a via da CaMKII e essa ativação por sua vez está envolvida na modulação da atividade da GGT pelo hormônio T_{3r}. Observamos ainda, que a ativação da PKA também modula o aumento da atividade da GGT. Gosh e colaboradores (2005) sugeriram que a PKA pode ter uma contribuição importante no papel dos HT na diferenciação dos astrócitos.

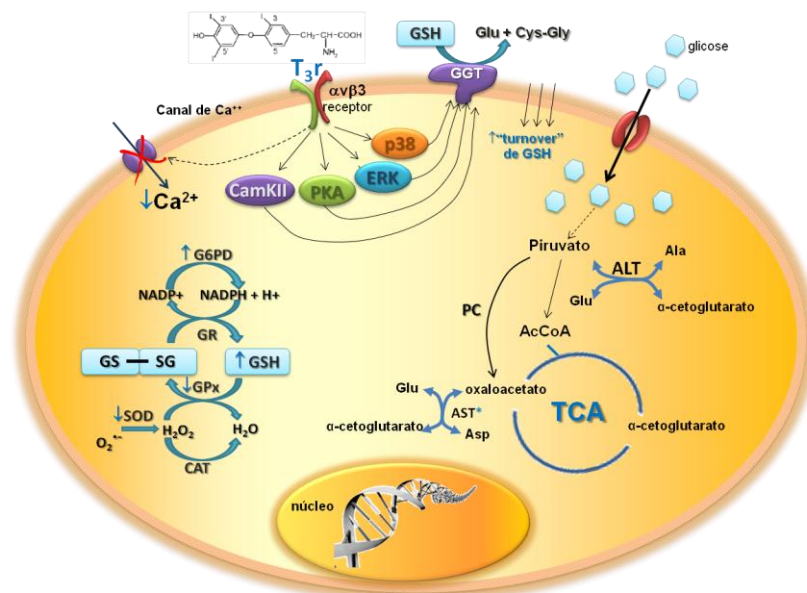
Apesar do hipotireoidismo não modificar a captação de [¹⁴C]-2-desoxiglicose, o T_{3r} estimulou a entrada de glicose em fatias de hipocampo de ratos hipotireoideos, embora este efeito não tenha ocorrido em tecido eutireoideo. Com o intuito de compreender, pelo menos em parte, o efeito do T_{3r} sobre o metabolismo energético, foram estudadas as ações dos HT sobre a atividade das aminotransferases, AST e ALT. Os resultados mostraram aumento na atividade destas aminotransferases em hipocampo de animais hipotireoideos em relação ao grupo eutireoideo, sendo que o T₄, mas não o T₃ nem o T_{3r}, foi capaz de reestabelecer a atividade da AST. Entretanto, nenhum dos HT testados foi capaz de alterar a atividade da ALT.

6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analisando nossos resultados em conjunto, sugerimos que o T_{3r} atua com um agente neuroprotetor frente ao estresse oxidativo induzido pelo hipotireoidismo congênito. Os dados obtidos neste estudo demonstram que o T_{3r} interage com receptores de superfície do tipo dímeros de integrina $\alpha\beta 3$, ativando cascatas de sinalização celular não genômicas (incluindo a vias da p38, ERK1/2, CaMKII, PKA) que levam a diminuição no influxo de Ca⁺⁺, aumento na atividade da GGT, estímulo na captação de glicose e reversão de diferentes parâmetros de estresse oxidativo. A figura 27 apresenta esquematicamente o mecanismo de ação não genômico proposto para o T_{3r} em hipocampo de ratos hipotireoideos em desenvolvimento.

Novos estudos são necessários com o intuito de melhor entender o mecanismo de ação, bem como papel fisiológico do T_{3r} no SNC, com o intuito de que futuramente este hormônio, ou análogos dele, possam ser propostos como ferramentas farmacológicas para o tratamento de patologias que comprometem a fisiologia de células neurais.

Figura 27- Mecanismo de ação proposto para o T_{3r} em hipocampo de ratos imaturos submetido ao modelo de hipotireoidismo congênito



O hipotireoidismo leva ao acúmulo de Ca^{++} intracelular e induz estresse oxidativo. Neste cenário, propomos que o T_{3r} interage com receptores de integrina $\alpha_v\beta_3$, ativando desta forma diversas rotas de transdução de sinal (PKA, CamKII, ERK1/2 e p38). Estes eventos acarretam em diminuição do influxo de Ca^{++} , estímulo na captação de glicose, assim como revertem o estresse oxidativo induzido pelo hipotireoidismo congênito. O T_{3r} estimula a atividade da G6PD, elevando desta forma os níveis de NADPH, importante doador de elétrons para as biossínteses redutoras, bem como para a redução da GSSG em GSH. Além disso, este hormônio aumentou os níveis do antioxidante mais importante no SNC, a GSH, bem como diminuiu a atividade da SOD e da GPx, enzimas fundamentais na detoxificação do H_2O_2 , sugerindo que a produção desta ERO pode estar diminuída pelo tratamento hormonal.

Consequentemente, observou-se diminuição da peroxidação lipídica. O aumento na captação de glicose induzida pelo T₃r sugere maior disponibilidade de substrato para o metabolismo energético, bem como para a síntese de neurotransmissores.

Fonte: Próprio Autor.

7 CONCLUSÕES

- O hormônio T_3r foi capaz de restaurar algumas alterações bioquímicas decorrentes do hipotireoidismo congênito em modelo animal, como a captação de Ca^{++} . Mostrando-se desta forma um possível agente neuroprotetor;
- O tratamento das fatias de hipocampo com T_3r foi capaz de restaurar os níveis de GSH, depletados em decorrência do hipotireoidismo. Ainda, o tratamento com este hormônio diminuiu a peroxidação lipídica das fatias de hipocampo dos animais hipotireoideos;
- O tratamento *in vitro* das fatias de hipocampo com T_3r foi capaz de alterar a atividade das enzimas antioxidantes: GGT, G6PD, SOD e GPx;
- O mecanismo não clássico, pelo qual o T_3r modula a atividade da GGT, tem início através da interação deste hormônio com receptor de integrina do tipo dímero $\alpha v\beta 3$. Esta interação por sua vez ativa diversas rotas de transdução de sinal (PKA, CaMKII, ERK1/2 e p38).

8 PERSPECTIVAS

As disfunções da tireoide figuram entre as patologias endócrinas de maior prevalência no mundo e os HT podem representar uma estratégia terapêutica importante no tratamento de neoplasias cerebrais, demência não Alzheimer, entre outros. Neste sentido, este estudo apresenta inúmeras perspectivas, propondo o T_{3r} como um hormônio biologicamente ativo no SNC, capaz modular diversos parâmetros bioquímicos. Entretanto, estudos mais aprofundados se fazem necessários para entender o papel fisiológicos deste hormônio sobre células neurais. Sendo assim, pretende-se dar continuidade a este trabalho, aprofundando a investigação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas ações do T_{3r} sobre células neuronais e gliais. Dentre as principais perspectivas de estudo, destacamos:

- Estudar a influência do T_{3r} sobre a expressão e atividade das enzimas envolvidas na síntese e metabolismo da glutatona: gama-glutamilcisteína sintetase, glutatona sintetase e GGT;
- Verificar a possível ação direta do T_{3r} sobre a atividade da GGT através de ensaios bioquímicos utilizando a enzima purificada.
- Investigar possíveis sítios de interação entre o T_{3r} e a GGT através de ensaios de “docking”.
- Caracterizar o efeito do T_{3r} sobre a modulação do sistema glutamatérgico investigando os seguintes parâmetros neuroquímicos: captação e liberação de glutamato; atividade da glutamina sintetase e expressão dos transportadores glutamatérgicos.
- Com o intuito de melhor entender o papel do T_{3r} na modulação do metabolismo energético hipocampal, pretende-se caracterizar o efeito deste hormônio sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória (I-V), de enzimas do ciclo de Krebs e da glicólise em fatias de hipocampo de ratos imaturos tratados ou não com T_{3r} .
- Investigar o efeito da administração in vivo do T_{3r} sobre a morfologia do hipocampo de ratos hipotireoideos.
- Avaliar o efeito do T_{3r} sobre a viabilidade e a proliferação de neurônios e astrócitos em cultura.

REFERÊNCIAS

- ABALOVICH, M.; LLESUY, S.; GUTIERREZ, S.; REPETTO, M. Peripheral parameters of oxidative stress in Graves' disease: the effects of methimazole and ¹³¹ iodine treatments. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 59, p. 321-7, 2003.
- ABRIAL, E; LUCAS, G.; SCARNA, H.; HADDJERI, N.; LAMBÁS-SEÑAS, L. A role for the pkc signaling system in the pathophysiology and treatment of mood disorders: involvement of a functional imbalance? **Mol Neurobiol.**, v. 44, p. 407-419, 2011.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 204, p. 234–254, 1984.
- ALBERTS, B., BRAY D. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 3a. Edição Artes Médicas Porto Alegre, 2011.
- ALEKSEENKO, A. V., LEMESHCHENKO, V. V., PEKUN, T. G., WASEEM, T. V.; FEDOROVICH, S. V. Glutamate-induced free radical formation in rat brain synaptosomes is not dependent on intrasynaptosomal mitochondria membrane potential. **Neurosci. Lett.**, v. 513, p. 238-242, 2012.
- ALLEN. N.J.; BARRES, B.A. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. **Curr Opin Neurobiol.** v.15, p.542-8, 2005.
- ALVA-SÁNCHEZ, C.; BECERRIL, A.; ANGUIANO, B.; ACEVES, C.; PACHECO-ROSADO, J. Participation of NMDA-glutamatergic receptors in hippocampal neuronal damage caused by adult-onset hypothyroidism. **Neurosci Lett**, v. 453, p. 178-178, 2009.
- AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, p. 571-91, 1989.
- ANDERSON, G.W. Thyroid hormones and the brain. **Front Neuroendocrinol.**, v. 22, p. 1-17, 2001.

ARMANO, S.; COCO, S.; BACCI, A.; PRAVETTONI, E.; SCHENK, U.; VERDERIO, C.; VAROQUIS, H.; ERICKSON, J. D.; MATTEOLI, M. localization and functional relevance of system a neutral amino acid transporters in cultured hippocampal neurons. **J Biol Chem.**, v. 277, p. 10467-10472, 2002.

ASHPOLE, N. M.; HUDMON, A. Excitotoxic neuroprotection and vulnerability with CaMKII inhibition. **Mol Cell Neurosci.**, v. 46, p. 720-730, 2011.

BAQUI, M.; BOTERO, D.; GEREKEN, B.; CURCIO, C.; HARNEY, J.W.; SALVATORE, D.; SORIMACHI, K.; LARSEN, P.R.; BIANCO, A. C. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 1206–1211, 2003.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R. BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23(4), p. 629-643, 2010.

BASSETT, J.H.D.; HARVEY, C.B.; WILLIAMS, G.R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. **Mol Cell Endocrinol.**, v.213, p.1–11, 2003.

BAUER, M.; WHYBROW, P.C. Thyroid hormone, neural tissue and mood modulation. **World J Biol Psychiatry.**, v. 2, p. 59-69, 2001.

BAUMANN, C.T.; MARUVADA, P.; HAGER, G.L.; YEN, P.M. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. Multiple protein interactions are required for nuclear retention. **J Biol Chem.**, v. 276, p. 11237-11245, 2001.

BERGH, J.J.; LIN, HY.; LANSING, L.; MOHAMED, S.N.; DAVIS, F.B.; MOUSA, S.; DAVIS, P.J. Integrin $\alpha v \beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. **Endocrinology**, v.146(7), p.2864–2871, 2005.

BERNAL, J. Action of thyroid hormone in brain. **J Endocrinol Invest.**, v. 25, p. 268-88, 2002.

BERNAL, J.; GUADAÑO-FERRAZ, A.; MORTE, B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. **Thyroid.**, v.13(11), p. 1005-1012, 2003.

BERNAL, J. Thyroid hormones and brain development. **Vitam and Hormon.**, v. 71, p.95-122, 2005.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med.**, v. 61, p. 882-90, 1963.

BHANJA, S.; CHAINY, G.B. PTU-induced hypothyroidism modulates antioxidant defence status in the developing cerebellum. **Int J Dev Neurosci.**, v. 28, p. 251-62, 2010.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination.. **Methods Enzymol.**, v 90, p.105-110, 1984.

BIRD, C.M.; BURGESS, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nat Rev Neurosci.**, v. 9, p. 182-94, 2008.

BOELAERT, K.; FRANKLYN, J.A. Thyroid hormone in health and disease. **J Endocrinol.**, v. 187, p.1-15, 2005.

BOLAND, R.; BUITRAGO, C.; DE BOLAND, A.R. Modulation of tyrosine phosphorylation signalling pathways by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D3. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 16, n. 6, p. 280-287, 2005.

BOUTROS, T. CHEVET, E.; METRAKOS, P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. **Pharmacol. Rev.**, 60, p. 261-310, 2008.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J.**, v. 34, p. 707-717, 1973.

BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch Biochem Biophys.**, v. 227(2), p. 534-541, 1983.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. CLERCK, L.; MASSARO, D. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. **In: oxygen, gene expression and cellular.**, v. 105, p. 1-25, 1997.

BOWLES, D.K.; TORGAN, C.E.; EBNER, S. Effect of acute, submaximal exercise on exercise on skeletal muscle vitamin E. **Free Radic Res Commun.**, v.14, p.139-143, 1991.

BRADY, S. T.; SIEGEL, G.. J.; ALBERS, R. W.; PRICE, D. L. **Basic Neurochemistry**: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology. 8 ed. Ed. Academic Press: USA, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS n° 822. Brasília, DF, 2001.

BRENT, A.G. Mechanisms of thyroid hormone action. **J Clin Invest.**, v. 122 (9), p.335-343, 2012.

BUITRAGO, C.G.; RONDA, A.C.; DE BOLAND, A.; BOLAND, R. MAP Kinases p38 and JNK are activated by the steroid hormone 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D3 in the C2C12 Muscle Cell Line. **Biochemistry.**, v. 97, p. 698-708, 2006.

CAFFREY, T. Transient hyperthyroidism of hyperemesis gravidarum: a sheep in wolf's clothing. **J Am Board Fam Pract.**, v. 13, p. 35-8, 2000.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol.**, v. 113, p. 484-490, 1985.

CARAGEORGIOU, H.; PANTOS, C.; ZARROS, A.; STOLAKIS, V.; MOUROUZIS, I.; COKKINOS, D.; TSAKIRIS, S. Effects of hyper-

and hypothyroidism on acetylcholinesterase, (Na(+), K (+))- and Mg (2+)-ATPase activities of adult rat hypothalamus and cerebellum. **Metab Brain Dis.**, v. 22, p. 31-38, 2007a.

CARAGEORGIOU, H.; PANTOS, C.; ZARROS, A.; STOLAKIS, V.; MOUROUZIS, I.; COKKINOS, D.; TSAKIRIS, S. Changes in acetylcholinesterase, Na⁺,K⁺-ATPase, and Mg²⁺-ATPase activities in the frontal cortex and the hippocampus of hyper- and hypothyroid adult rats. **Metabolism.**, v. 56, p.1104-10, 2007b.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem Toxicol.**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CATTANI, D.; GOULART, P.B.; CAVALLI, V.L.L.O.; DUARTE, E.W.; DOSSANTOS, A.Q.; PIEROZAN, P.; DE SOUZA, D.F.; WOHL, V.M.; FERNANDES, M.C.; SILVA, F.R.M.B.; GONÇALVES, C.A.; PESSOA-PUREUR, R.; ZAMONER, A. Congenital hypothyroidism alters the oxidative status, enzyme activities and morphological parameters in the hippocampus of developing rats. **Mol Cell Endocrinol.**, v.375, p.14–26, 2013.

CHANCE, B.; SIES, H. & BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev.**, v. 59, p. 527-602, 1979.

CHAKRABARTI, N.; RAY, A.K. Rise of intrasynaptosomal Ca²⁺ level and activation of nitric oxide synthase in adult rat cerebral cortex pretreated with 3-5-3'-L-triiodothyronine. **Neuropsychopharmacology**, v.22(1), p. 36-41, 2000.

CHATTOPADHYAY, S.; SAHOO, D.K.; SUBUDHI, U.; CHAINY, G.B. Differential expression profiles of antioxidant enzymes and glutathione redox status in hyperthyroid rats: a temporal analysis. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.**, v. 146, p. 383-91, 2007.

CHENG, S.Y., LEONARD, J.L., DAVIS, P.L. Molecular aspects of thyroid hormone actions. **Endocrine Ver.**, v. 31, p. 139-170, 2010.

CHOPRA I.J.; SACK J.; FISHER D.A. 3,3',5'-Triiodothyronine (reverse T3) and 3,3',5-triiodothyronine (T3) in fetal and adult sheep: studies of metabolic clearance rates, production rates, serum binding, and thyroidal content relative to thyroxine. *Endocrinology*. v. 97(5), p 1080-8, 1975.

CONN, P.J.; PIN, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v.37, p.205-37, 1997.

CORDES, J.; CANO, J.; HAUPT, M. Reversible dementia in hypothyroidism. **Nervenarzt.**, v. 7, p. 588-90, 2000.

COULTER, D. A.; EID, T. Astrocytic Regulation of Glutamate Homeostasis in Epilepsy. **Glia.**, v.60, p.1215-1226, 2012.

COYLE, J.T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science.**, v.262, p. 689-95, 1993.

D'AREZZO, S.; INCERPI, S.; DAVIS, F.B.; ACCONCIA, F.; MARINO, M.; FARIAS, R.N.; DAVIS, P.J. Rapid Nongenomic Effects of 3,5,3-Triiodo-L-Thyronine on the Intracellular pH of L-6 Myoblasts Are Mediated by Intracellular Calcium Mobilization and Kinase Pathways. **Endocrinology.**, v. 145(12), p.5694–5703, 2004.

DANBOLT, N. C.; Glutamate uptake. **Prog Neurobiol.**, v. 65, p. 1-105, 2001.

DARRAS V.M.; HUME R.; VISSER, T.J. Regulation of thyroid hormone metabolism during fetal development. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 151, p.37–47, 1999.

DAS, K.; CHAINY, G.B. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defence system by thyroid hormone. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1537, p. 1-13, 2001.

DAS, K.; CHAINY, G.B. Thyroid hormone influences antioxidant defense system in adult rat brain. **Neurochem Res.**, v. 29, p. 1755-66, 2004.

DASGUPTA, A.; DAS, S.; SARKAR, P.K. Thyroid hormone stimulates gamma-glutamyl transpeptidase in the developing rat cerebra and in astroglial cultures. **J Neurosci Res.**, v. 82, p. 851-7, 2005.

DASGUPTA, A.; DAS, S.; SARKAR, P.K. Thyroid hormone promotes glutathione synthesis in astrocytes by up regulation of glutamate cysteine ligase through differential stimulation of its catalytic and modulator subunit mRNAs. **Free Radic Biol Med.**, v. 42, p. 617-26, 2006.

DASGUPTA, A.; DAS, S.; SARKAR, P.K. Thyroid hormone promotes glutathione synthesis in astrocytes by up regulation of glutamate cysteine ligase through differential stimulation of its catalytic and modulator subunit mRNAs. **Free Radic Biol Med.**, v. 42, p. 617–626, 2007.

DASURI, K.; ZHANG, L.; KELLER, J.N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. **Free Radic Biol Med.**, v. 62, p. 170-85, 2013.

DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B.; CODY, V. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. **Trends Endocrinol Metab.**, v.16(9), p. 429-435, 2005.

DAVIS, F.B.; TANG, HY.; SHIH, A.; KEATING, T.; LANSING, L.; HERCBERGS, A.; FENSTERMAKER, R.A.; MOUSA, A.; MOUSA, S.A.; DAVIS, P.J.; HUNG-YUN LIN, HY. Acting via a Cell Surface Receptor, Thyroid Hormone Is a Growth Factor for Glioma Cells. **Cancer Research.**, v.66, p.7270-7275, 2006.

DAVIS, P.J.; LEONARD, J.L.; DAVIS, F.B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. **Front Neuroendocrinol.**, v.29, p.211–218, 2008.

DAVIS, P.J.; ZHOU, M.; DAVIS, F.B.; LANSING, L.; MOUSA, S.A.; LIN, HY. Mini-review: Cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. **Physiology & Behavior.**, v.99, p. 237–239, 2010.

DE CARVALHO, T.M.; DOS SANTOS, H.P.; DOS SANTOS, I.C.G.P.; VARGAS, P.R.; PEDROSA, J. Newborn screening: A national public health programme in Brazil. **J Inherit Metab Dis.**, v. 30, 2007. DOI 10.1007/s10545-007-0650-7

DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Glutathione in Defense and Signaling: Lessons from a Small Thiol. **Ann. N.Y.Acad. Sci.**, v. 973, p. 488-504, 2002a.

DRATMAN, M.B.; On the mechanism of action of thyroxine, an amino acid analog of tyrosine. **J Theor Biol.**, v. 46(1), p.255-70, 1974.

DRATMAN, M.B.; GORDON, J.T. Thyroid hormones as neurotransmitters. **Thyroid.**, v. 6(6), p. 639-47, 1996.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J.M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **Eur J Biochem.**, v. 267, p. 4912-6, 2000.

DROZDZ, R.; PARMENTIER, C.; HACHAD, H.; LEROY, P.; SIEST, G.; WELLMAN, M. Gamma-glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. **Free Radic Biol Med.**, v. 25, p. 786-792, 1998.

FAIVRE-SARRAILH, C.; RABIÉ, A. A lower proportion of filamentous to monomeric actin in the developing cerebellum of thyroid-deficient rats. **Brain Res.**, v. 469, p. 293-7, 1988.

FARWELL, A.P.; LYNCH, R.M.; OKULICZ, W.C.; CORNI, A.M.; LEONARD, J.L. The Actin Cytoskeleton Mediates the Hormonally Regulated Translocation of Type II Iodothyronine 5'-Deiodinase in Astrocytes. **J Biol Chem.**, v. 265 (30), p.18546-18553, 1990.

FARWELL, A.P.; TRANTER, M.P.; LEONARD, J.L. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. **Endocrinology.**, v. 136, p. 3909-15, 1995.

FARWELL A.P.; DUBORD-TOMASETTI S.A. Thyroid Hormone Regulates the Extracellular Organization of Laminin on Astrocytes. **Endocrinology**, v. 140(11), p. 5014-21, 1999.

FARWELL A.P.; DUBORD-TOMASETTI S.A.; PIETRZYKOWSKIA A.Z.; STANLEY J. STACHELEKB S.J.; LEONARD, A.J.L. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3V,5V-triiodothyronine. **Brain Res Dev Brain Res.**, v. 154, p.121– 135, 2005.

FARWELL, A.P.; SUSAN A.; DUBORD-TOMASETTI; PIETRZYKOWSKI, A.Z.; LEONARD, J.L. Dynamic Nongenomic Actions of Thyroid Hormone in the Developing Rat Brain. **Endocrinology**, v.147(5), p.2567–2574, 2006.

FELLIN T.; PASCUAL, O.; GOBBO, S.; POZZAN, T.; HAYDON, P.G.; CARMIGNOTO, G. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. **Neuron**, v.43, p. 729–743, 2004.

FERNÁNDEZ, M.; PARADISI, M.; DEL VECCHIO, G.; GIARDINO, L.; CALZÀ, L. Thyroid hormone induces glial lineage of primary neurospheres derived from non-pathological and pathological rat brain: implications for remyelination-enhancing therapies. **Int J Dev Neurosci**, v. 27, p. 769-78, 2009.

FERNÁNDEZ-LAMO, I.; MONTERO-PEDRAZUELA, A.; DELGADO-GARCÍA, J.M.; GUADAÑO-FERRAZ, A.; GRUART, A. Effects of thyroid hormone replacement on associative learning and hippocampal synaptic plasticity in adult hypothyroid rats. **Eur J Neurosci**, v. 30, p.679-92, 2009.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43(1), p. 61-68, 1997.

FISHER, D.A. The importance of early management in optimizing IQ in infants with congenital hypothyroidism. **Pediatrics**, v.136(3), p. 273-274, 2000.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 105(1), p. 114–121, 1984.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem.**, v. 42, p. 1-11, 1984.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A.. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Mol Aspects Med.**, v. 30, p. 1-12, 2009.

FRIDOVICH, I. Superoxide and evolution. **Horiz Biochem Biophys.**, p. 1-37, 1974.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J Exp Biol.**, v. 201, p. 1203-1209, 1997.

FYLKESNES, S.I; NYGAARD, H.A. Dementia and Hypothyroidism. **Tidss Nor Laegeforen.**, v. 120, p. 905-7, 2000.

GASIC, G.P.; HOLLMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annu Rev Physiol.**, v.54, p.507-36, 1992.

GAUDINO, R.; GAREL, C.; CZERNICHOW, P.; LÉGER J. Proportion of various types of thyroid disorders among newborns with congenital hypothyroidism and normally located gland: a regional cohort study. **Clin Endocrinol (Oxf)**., v. 62(4), p.444-8, 2005.

GEREGEN, B.; ZEÖLD, A.; DENTICE, M.; SALVATORE, D.; BIANCO, A.C. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. **Cell Mol Life Sci.**, v. 65, p. 570-590, 2008.

GERGES, N.Z.; ALZOUBI, K.H.; ALKADHI, K.A. Role of phosphorylated CaMKII and calcineurin in the differential effect of hypothyroidism on LTP of CA1 and dentate gyrus. **Hippocampus.**, v.15, p. 480-90, 2004.

GHOSH, M.; GHARAMI, K.; PAUL, S.; DAS, S. Thyroid hormone-induced morphological differentiation and maturation of astrocytes

involves activation of protein kinase A and ERK signalling pathway. **Eur J Neurosci.**, v.22, p. 1609-17, 2005.

GINÉ, E; MORALES-GARCIA, J.A.; PEREZ-CASTILLO, A.; SANTOS, A. Developmental Hypothyroidism Increases the Expression of Kainate Receptors in the Hippocampus and the Sensitivity to Kainic Acid-Induced Seizures in the Rat. **Endocrinology.**, v. 151(7), 2010 (in press).

GOODE, H.F.; COWLEY, H.C. & WALER, B.E. Decrease antioxidant status and peroxidation in patient with septic shock and secondary organ dysfunction. **Crit Care Med.**, v. 23, p. 646-651, 1995.

GRESPIN, M.E.; BONAMY, G.M.; ROGGERO, V.R.; CAMERON, N.G.; ADAM, L.E.; ATCHISON, A.P.; FRATTO, V.M.; ALLISON, L.A. Thyroid hormone receptor $\alpha 1$ follows a cooperative CRM1/calreticulin-mediated nuclear export pathway. **J Biol Chem.**, v. 283, p. 25576-25588, 2008.

GROSSMAN, S.A.; BATARA, J.F. Current management of glioblastoma multiforme. **Semin Oncol.**, v. 31(5), p. 635-44, 2004.

GUADANÕ-FERRAZ, A.; ESCÁ MEZ, MJ.; ESTRELLA RAUSELL E.; BERNAL J. Expression of Type 2 Iodothyronine Deiodinase in Hypothyroid Rat Brain Indicates an Important Role of Thyroid Hormone in the Development of Specific Primary Sensory Systems. **J Neurosci.**, v. 19(9), p.3430–3439, 1999.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radic. Biol. Med.**, 18, 125–126, 1995.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C.. ed. 4. **Free Radic. Biol. Med.**, Oxford: Clarendon Press, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, 35, 1147–1150, 2007.

HERCBERGS, A.A.; GOYAL, L.K.; SUH, J.H.; LEE, S.; REDDY, C.A.; COHEN, B.H.; STEVENS, G.H.; REDDY, S.K.; PEEREBOOM,

D.M.; ELSON, P.J.; GUPTA, M.K.; BARNETT, G.H. Propylthiouracil-induced chemical hypothyroidism with high-dose tamoxifen prolongs survival in recurrent high grade glioma: a phase I/II study. **Anticancer Res.**, v. 23(1B), p.617-26, 2003.

HERNANDEZ, A.; MORTE B.; BELINCHÓN M.M.; CEBALLOS A.; BERNAL J. Critical Role of Types 2 and 3 Deiodinases in the Negative Regulation of Gene Expression by T3 in the Mouse Cerebral Cortex. **Endocrinology**., v. 153(6), p. 2919-28, 2012.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol.**, v. 26, p. 277-285, 1989.

HERTZ, L.; DRINGEN, R.; SCHOUSBOE, A.; ROBINSON, S.R. Astrocytes: glutamate producers for neurons. **J Neurosci Res.**, v. 57, p. 417-28, 1999.

HOLSBERGER DR, COOKE PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. **Cell Tissue Res.**, v.322, p.133–140, 2005.

HOU, G.; YANG, X.; YUAN, TF. Hippocampal asymmetry: differences in structures and functions. **Neurochem Res.**, v. 38(3), 2013. doi: 10.1007/s11064-012-0954-3.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova.**, v. 31, n. 5, 1170-1179, 2008.

INOUE, M.; SATO, E.F.; NISHIKAWA, M.; PARK, A.M.; KIRA, Y.; IMADA, I.; UTSUM, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Curr Med Chem.**v. 10, p. 2495-2505, 2003.

ISHISAKI, A.; TOKUDA, H.; YOSHIDA, M.; HIRADE, K.; KUNIEDA, K.; HATAKEYAMA, D, SHIBATA, T.; KOZAWA, O. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. **Mol Cell Endocrinol.**, v.214, p. 189-95, 2004.

JOUVENCEAU, A.; HÉDOU, G.; POTIER, B.; KOLLEN, M.; DUTAR, P.; MANSUY, I.M. Partial inhibition of PP1 alters bidirectional synaptic plasticity in the hippocampus. **Eur J Neurosci.** v.24, p. 564-72, 2006.

KAPFHAMER, D.; KING, I.; ZOU, M. E.; LIM, J. P.; HEBERLEIN, U.; WOLF, F. W. JNK Pathway Activation Is Controlled by Tao/TAOK3 to Modulate Ethanol Sensitivity. **PLoS One**, v. 7, 2012.

KETTENMANN, H.; RANSOM, B.R: **Neuroglia**. New York: Oxford University Press, 1995.

KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, p. 675-7, 1992.

KÖHRLE, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. **Mol Cell Endocrinol.** v. 151, p. 103–119, 1999.

KOURY J.C, DONANGELO CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr.** v.16, p.:433-41, 2003.

KRAUSS, G. Intracellular Messenger Substances: “Second Messengers”. In: **Biochemistry of Signal Transduction and Regulation**. 3 ed. Darmstadt: Druckhaus Darmstadt GmbH, 2003.

KRISHNA M., NARANG H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cell Mol Life Sci.**, v. 65, p. 3525-44, 2008.

KUMAR, C.C. Signaling by integrin receptors. **Oncogene**, v.17, p.1365-1373, 1998.

KUMAR, T.R.; WISEMAN, A.L.; KALA, G.; KALA, S.V.; MATZUK, M.M.; LIEBERMAN, M.W. Reproductive defects in gamma-glutamyl transpeptidase - deficient mice. **Endocrinology.**, v. 141, p.4270-4277, 2000.

LANOUE, K. F.; BERKICH, D. A.; CONWAY, M.; BARBER, A. J.; HU, L. Y.; TAYLOR, C.; HUTSON, S. Role of specific

aminotransferases in de novo glutamate synthesis and redox shuttling in the retina. **J Neurosci Res.**, v. 66, p. 914-922, 2001.

LEI, J.; NOWBAR, S.; MARIASH, C.N.; INGBAR, D.H. Thyroid hormone stimulates Na-K-ATPase activity and its plasma membrane insertion in rat alveolar epithelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 285, p. 762-72, 2003.

LEI, J.; MARIASH, C.N.; BHARGAVA, M.; WATTENBERG, E.V.; INGBAR, D.H. T3 increases Na-K-ATPase activity via a MAPK/ERK1/2-dependent pathway in rat adult alveolar epithelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 292, p. 749-54, 2008.

LEONARD, J.L.; FARWELL, A.P., Thyroid hormone-regulated actin polymerization in brain. **Thyroid.**, v. 7, p. 147-51, 1997.

LEONARD, J.L. Non-genomic actions of thyroid hormone in brain development. **Steroids**, v. 73, p. 1008–1012, 2008.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, v.186, p.464-478, 1990.

LIN, H.Y.; TANG, H.Y.; SHIH, A.; KEATING, T.; CAO, G.; DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. **Steroids.**, v.72, p.180-7, 2006.

LIN, H.Y.; SUN, M.; TANG, H.Y.; LIN, C.; LUIDENS, M.K.; MOUSA, S.A.; INCERPI, A.; DRUSANO, G.L.; DAVIES, F.B.; DAVIES, P.J. L-thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 296, p. C980-C991, 2009.

LISMAN J. Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 358, p. 829-42, 2003.

LOPES, J.P.; OLIVEIRA, S.M.; FORTUNATO, J.S. Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β -pancreáticas relação com as complicações da diabetes mellitus tipo 2. **Acta Med Port.** v. 21, p. 293-302, 2008.

LÖSEL, R.; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nat Rev Mol Cell Biol.**,v.4(1), p.46-56, 2003.

LOSI, G.; GARZON, G.; PUJA, G. Nongenomic regulation of glutamatergic neurotransmission in hippocampus by thyroid hormones. **Neuroscience.**, v. 151, p. 155-63, 2008.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-267, 1951.

MAGISTRETTI, P.J.; PELLERIN, L. Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. **News Physiol Sci**, v.14, p. 177-182, 1999.

MAGUPALLI, V. G.; MOCHIDA, S.; YAN, J.; JIANG, X.; WESTENBROEK, R. E.; NAIRN, A. C.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. Ca^{2+} -independent Activation of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II Bound to the C-terminal Domain of $\text{CaV}2.1$ Calcium Channels. **JBC Papers in Press.**, 2012.

MARES, V.; MALÍK, R.; LISÁ, V.; SEDO, A. Up-regulation of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activity in growth perturbed C6 astrocytes. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 136, p.75–80, 2005.

MARTIN, J.V.; WILLIAMS, D.B.; FITZGERALD, R.M.; IM, H.K.; VONVOIGTLANDER, P.F. Thyroid hormonal modulation of the binding and activity of the GABAA receptor complex of brain. **Neuroscience**, v.73(3), p.705-13, 1996.

MARTINEZ, R.; GOMES, F.C.; Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. **J Biol Chem**. v. 277, p. 49311-49318, 2002.

MASON, G.A.; WALKER, C.H.; PRANGE, A.J. Modulation of gamma-aminobutyric acid uptake of rat brain synaptosomes by thyroid hormones. **Neuropsychopharmacology**, v.1(1), p.63-70, 1987.

MASON, G.A.; WALKER, C.H.; PRANGE, A.J. Depolarization-dependent ^{45}Ca uptake by synaptosomes of rat cerebral cortex is enhanced by L-triiodothyronine. **Neuropsychopharmacology**, v. 3(4), p.291-5, 1990

MASON, G.A.; WALKER, C.H.; PRANGE, A.J. L-triiodothyronine: is this peripheral hormone a central neurotransmitter? **Neuropsychopharmacology**, v. 8(3), p.253-8, 1993.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; NÚÑEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem**, v. 32, p. 595-603, 1999.

MATTSON, M.P. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. **Neuromolecular Medicine**, v.3, n.2, p.65-94, 2003.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**. v. 52, p. 711-760, 1983.

MELLO, A.C.F.; HOFFMAN, M.E.; MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**. v. 218, p. 273-275, 1983.

MENON, B.; RAMALINGAM, K.; KUMAR, R.V. Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 21, p. 780-4, 2012.

MERONI, S.; CÁNEPA, D.; PELLIZZARI, E.; SCHTEINGART, H.; CIGORRAGA, S. Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase activity by Ca^{2+} - and protein kinase C-dependent pathways in Sertoli cells. **Int J Androl.**, v. 20, p. 189-94, 1997.

MICHAELIS, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Progress in neurobiology**, v. 54, p. 360 – 415,, 1998.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, 247:188–92, 1972.

MIYAMOTO, E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. **J Pharmacol Sci**. v.100, p. 433-42, 2006.

MOELLER, L.C.; CAO, X.; DUMITRESCU, A.M.; SEO, H.; REFETOFF, S. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Nucl Recept Signal**. v.4, p.1-4, 2006.

MONTAVON, P.; KUKIC, K.R.; BORTLIK, K. A simple method to measure effective catalase activities: optimization, validation, and application in green coffee. **Anal Biochem**, v. 360, p. 207-15, 2007.

MORRIS, R.G. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. **Eur J Neurosci**, v. 23(11), p. 2829-46, 2006.

MORTE, B.; DÍEZ, D.; AUSO, E.; BELINCHÓN, M.M.; GIL-IBÁÑEZ, P.; GRIJOTA-MARTÍNEZ, C.; NAVARRO, D.; MORREALE DE ESCOBAR, G.; BERBEL, P.; BERNAL, J. Thyroid Hormone Regulation of Gene Expression in the Developing Rat Fetal Cerebral Cortex: Prominent Role of the Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV Pathway. **Endocrinology**, v.151, p. 810-820, 2010.

MURPHY, M.P. Calcium uptake by liver mitochondria from hypothyroid rats is inhibited in vitro by triiodothyronine. **Biochem Int.**, v. 27, p. 1019-26, 1992.

NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nat Rev Neurosci** , v.3, 2002.

NICIU, M.J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, p. 656-64, 2012.

NIGAM, S.; SCHEWE, T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1488, p.167-181, 2000.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

NUTTALL J. R.; OTEIZA P. I. Zinc and the ERK kinases in the developing brain. **Neurotox Res.**, v. 21, p. 128-41, 2012.

OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J. Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. **J Comp Neurol**, v. 229, p. 374-92, 1984.

PALMADA, M.; CENTELLES, J. J. Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. **Front Biosci**. p. 701-718, 1998.

PAMPLONA, R.; PORTERO-OTÍN, M.; RUIZ, C.; BELLMUNT, M.J.; REQUENA, J.R.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W.; ROMERO, M.; LÓPEZ-TORRES, M.; BARJA, G. Thyroid status modulates glycoxidative and lipoxidative modification of tissue proteins. **Free Radic Biol Med.**, v. 27, p. 901-10, 1999.

PAN, T.; ZHONG, M.; ZHONG, X.; ZHANG, Y.; ZHU, D. Levothyroxine replacement therapy with vitamin E supplementation prevents oxidative stress and cognitive deficit in experimental hypothyroidism.. **Endocrine.**, v. 43, p. 434-9, 2013.

PARPURA, V.; VERKHRATSKY, A. Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling. **Croat Med**, v. 53, p. 518-28, 2012.

PASQUINI, J.M.; ADAMO, A.M. Thyroid hormones and the central nervous system. **Dev Neurosci.**, v. 16, p.1-8, 1994.

PATRICK, R. L. Synaptic Clefts Are Made to Be Crossed: Neurotransmitter Signaling in the Central Nervous System. **Toxicologic Pathology**, v. 28, p. 31-36, 2000.

PATRICK, L. Thyroid disruption: mechanism and clinical implications in human health. **Altern Med Rev.**v.14(4), p.326-46, 2009.

PEARSON, G. ROBINSON. F.; BEERS GIBSON, T.; XU, B.E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr. Rev.** 22, p.153–183, 2001.

PLOW, E.F.; HAAS, T.A.; ZHANG, L.; LOFTUSI, J.; SMITH, J.W. Ligand Binding to Integrins. **J Biol Chem.**, v. 275(29), p.21785-21788, 2000.

POLAK, M. Hyperthyroidism in early infancy: pathogenesis, clinical features and diagnosis with a focus on neonatal hyperthyroidism. **Thyroid**, v. 8, p. 1171–7, 1998.

POPOLI, M.; YAN, Z.; MCEWEN, B.S.; SANACORA G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci.** v.13, p. 22-37, 2011.

RAHAMAN, S.O.; GHOSH,S.; MOHANAKUMAR, K.P.; DAS,S.; SARKAR, P.K. Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments. **Neurosci Res.**, v. 40, p. 273-9, 2001.

RAHMAN K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clin Interv Aging**, v. 2, p. 219-36, 2007.

RASTOGI, M.V.; LAFRANCHI, S.H. Congenital hypothyroidism. **Orphanet J Rare Dis**, v.5, 2010.

ROTI, E.; BRAVERMAN, L.E.; FANG, S.L.; ALEX S.;EMERSON,C.H.Ontogenesis of placental inner ring thyroxine deiodinase and amniotic fluid 3,3',5'triiodothyronine concentration in the rat. **Endocrinology.** v.111(3), p.959-63, 1982.

ROUX, P.P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of protein kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiol Mol Biol Rev.**, p. 320–344, 2004.

SAGAR, G.D.V.; GEREBEN, B.Z.; CALLEBAUT, I.; MORNON JP.; ZEOLD A.; DA SILVA, W. S.; LUONGO, C.; DENTICE, M.; 1 SUSANA M. TENTE, S.M.; FREITAS, B.C.G.; HARNEY, J.W.; ZAVACKI, AM.; BIANCO, A.C. Ubiquitination-Induced Conformational Change within the Deiodinase Dimer Is a Switch Regulating Enzyme Activity. **Mol Cell Biol.** v. 27, p.4774-4783, 2007.

SAGAR, G.D.V.; GEREBEN, B.; CALLEBAUT, I.; MORNON JP.; ZEOLD A.; CURCIO-MORELLI, C.; HARNEY, J.W.; LUONGO, C.; MULCAHEY, M.A.; LARSEN, P.R.; HUANG, A.S.; BIANCO, A.C. The Thyroid Hormone-Inactivating Deiodinase Functions as a Homodimer. **Mol. End.** v. 22(6), p.1382–1393, 2008.

SANACORA, G.; ZARATE, C.A.; KRYSTAL, J.H.; MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, p. 426-37, 2008.

SÁNCHEZ, G.M. **Ambiente anti-oxidante/pro-oxidante su impacto medico.** 1ª ed. Aracne, 2012.

SANTOS, H.S.; CRUZ, W.M.S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 47. n. 3. p. 303-308, 2001.

SARKAR, P.K.; RAY, A.K. Synaptosomal action of thyroid hormone: changes in Na(+)-K(+)-ATPase activity in adult rat cerebral cortex. **Horm Metab Res**, v. 25(1), p.1-3, 1993.

SARKAR, P.K.; RAY, A.K. Specific binding of L-triiodothyronine modulates Na(+)-K(+)-ATPase activity in adult rat cerebrocortical synaptosomes. **Neuroreport**, v.9(6), p. 1149-52, 1998.

SARKAR P.K. In quest of thyroid hormone function in mature mammalian brain. **Indian J Exp Biol**, v. 40(8), p. 865-73, 2002.

SCANDALIOS, J.G. Introduction to Oxyradicals. **Free Radic. Biol. Med** v. 23, n. 3, p. 471-472, 1997.

SCHWARTZ, H.L.; CARTER, A.C.; KYDD, D.M; GORDON, A.S. Relationship of red blood cell 131-I-L-triiodothyronine binding coefficient and cell maturation. II. Effect of cell age and metabolic inhibitors. **Endocrinology**, v. 80(1), p.65-8, 1967.

SCHWARTZ, Z.; SYLVIA, V.L; LARSSON, D.; NEMERE, I.; CASSOLA, D.; DEAN, D.; BOYAN, D. 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ regulates chondrocyte matrix vesicle protein kinase D (PKC) directly via G protein-dependent mechanisms and indirectly via incorporation of PKC during matrix vesicle biogenesis. **J Biol Chem**. v. 277, p. 11828–11837, 2002.

SEGAL, J.; INGBAR, S.H. Evidence that an increase in cytoplasmic calcium is the initiating event in certain plasma membrane-mediated responses to 3,5,3'-triiodothyronine in rat thymocytes. **Endocrinology**. v.124(4), p.1949-55, 1989.

SEGAL, J. In vivo effect of 3,5,3'-triiodothyronine on calcium uptake in several tissues in the rat: evidence for a physiological role for calcium as the first messenger for the prompt action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane., **Endocrinology**., v.127, p. 17-24, 1990.

SELENKOW, H.A. Therapeutic considerations for thyrotoxicosis during pregnancy. In: Fisher, DA, Burrow GN (Eds.). **Perinatal Thyroid Physiology and Disease**. Raven Press, New York, p. 145-61, 1975.

SILVA, F.R.M.B.; DIFINI LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; CARLA D'AGOSTINI, C.; ZAMONER, A. Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. **Life Sciences**. v.69, p. 977–986, 2001.

SKELDING, K. A.; SPRATT, N. J.; FLUECHTER, L.; DICKSON, P. W.; ROSTAS, J. A. P. α -CaMKII is differentially regulated in brain regions that exhibit differing sensitivities to ischemia and excitotoxicity. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 32, p. 2181-2192, 2012.

SLEKAR, K. H.; KOSMAN, D. J.; CULOTTA, V. C. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. **J Biol Chem**., v. 46, p.28831-36. 1996.

SMALL, S.A.; SCHOBEL, S.A.; BUXTON, R.B.; WITTER, M.P.; BARNES, C.A. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. **Nat Rev Neurosci**, v.12, p. 585-601, 2011.

STACHELEK, S.J.; KOWALIK, T.F.; FARWELL, A.P.; LEONARD, J.L. Myosin V plays an essential role in the thyroid hormone-dependent endocytosis of type II iodothyronine 5'-deiodinase. **J Biol Chem.**, v. 275(41), p.31701-7, 2000.

STEINHÄUSER, C.; GALLO, V. News on glutamate receptors in glial cells. **Trends Neurosci.** v. 19, p.339-45, 1996.

STENZEL, D.; HUTTNER, W.B. Role of maternal thyroid hormones in the developing neocortex and during human evolution. **Front Neuroanat**, v.19, 2013.

STONE, M.E; GRIMES B.S.; KATZ, D.B. Hippocampal inactivation enhances taste learning. **Learn Mem**, v.12, p.579-86, 2005.

SUI, L.; REN, W.W.; LI, B.M. Administration of thyroid hormone increases reelin and brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus in vivo. **Brain Res.** v. 1313, p. 9-24, 2010.

SUN, E.; XU, H.; LIU, Q.; ZHOU, J.; ZUO, P.; WANG, J. The mechanism for the effect of selenium supplementation on immunity. **Biol Trace Elem Res**, v. 48, p. 231-8, 1995.

TATEISHI, N.; HIGASHI, T.; NARUSE, A.; NAKASHIMA, K.; SHIOZAKI, H. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. **J Nutr**, v. 107, p. 51-60, 1977.

THEODOSIS, D.T.; PIET, R.; POULAIN, D.A.; OLIET, S.H. Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. **Neurochem Int**, v. 45(4), p. 491-501, 2004.

TREISMAN R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. **Curr Opin Cell Biol.** v. 8, n. 2, p. 205-215, 2006.

TUNÇMEN, H.; TÜZMEN, M.N. Biochemical Effects of Pesticide Contaminated Drinking Water on Lipid Peroxidation and Free-Radical Scavenger. Hacettepe. **J. Biol. & Chem.**, v. 35 , p. 111-116, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.** v. 160, p. 1-40, 2006.

VALLORTIGARA, J.; ALFOS, S.; MICHEAU, J.; HIGUERET, P.; ENDERLIN, V. T3 administration in adult hypothyroid mice modulates expression of proteins involved in striatal synaptic plasticity and improves motor behavior. **Neurobiol Dis.**, v.31, p. 378-35, 2008.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova.** v. 30. n. 5. p. 1323-1338, 2007.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. **Cell Mol Life Sci.**, v. 63, p. 414-34, 2006.

VINATIER, D. Integrins and reproduction. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.**, v. 59, p. 71-81, 1995.

WIENS, S.C.; TRUDEAU, V.L. Thyroid hormone and gamma-aminobutyric acid (GABA) interactions in neuroendocrine systems. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 144(3), p. 332-44, 2006.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; MARCON, J. L. et al. Comparative antioxidant defenses in vertebrates - Emphasis on fish and mammals. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol** v. 7, p. 33-45, 2000.

WILLIAMS, G.R. Cloning and Characterization of Two Novel Thyroid Hormone Receptor b Isoforms. **Mol Cell Endocrinol.** v.20 (22), p. 8329-8342, 2000.

WING, D.A.; MILLER, L.K.; KOONINGS, P.P. A comparison of propylthiouracil versus methimazole in the treatment of hyperthyroidism in pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 170, p. 90-5, 1994.

WONG, C.C.; LEUNG, M.S. Effects of neonatal hypothyroidism on the expressions of growth cone proteins and axon guidance molecules related genes in the hippocampus. **Mol Cell Endocrinol**, v. 184, p. 143-50, 2001.

YAVUZ, D.G.; YAZICI, D.; TOPRAK, A.; DEYNELI, O.; AYDIN, H.; YÜKSEL, M.; AKALIN, S. Exogenous subclinical hyperthyroidism impairs endothelial function in nodular goiter patients. **Thyroid**. v. 18, p. 395-400, 2008.

YILMAZ, S.; OZAN, S.; BENZER, F.; CANATAN, H. Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. **Cell Biochem Funct.**, v. 21, p. 325-30, 2003.

ZAMONER, A.; CORBELINI, P.F.; FUNCHAL, C.; MENEGAZ, D.; SILVA, F.R.M.B.; PESSOA-PUREUR, R. Involvement of calcium-dependent mechanisms in T3-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. **Life Sci**. v.77, p. 3321–3335, 2005.

ZAMONER, A.; BRUNO A.N.; CASALI, E.A.; CORBELINI, P.F.; DINIZ G.P.; BARRETO-CHAVES, M.L.M.; SILVA F.R.M.B.; SARKIS, J.J.F.; PESSOA-PUREUR, R. Genomic-independent action of thyroid hormones on NTPDase activities in Sertoli cell cultures from congenital hypothyroid rats. **Life Sci**.v.80, p.51–58, 2006a.

ZAMONER, A.; FUNCHAL C.; HEIMFARTH, L.; SILVA, F.R.M.B.; PESSOA-PUREUR, R. Short-Term Effects of Thyroid Hormones on Cytoskeletal Proteins Are Mediated by GABAergic Mechanisms in Slices of Cerebral Cortex from Young Rats. **Mol Cell Endocrinol.**, v.26(2), p. 209-224, 2006b.

ZAMONER, A.; ROYER, C.; BARRETO, K.P.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neurosci Res**. v.57, p.98-103, 2007a.

ZAMONER, A.; FUNCHAL, C.; JACQUES-SILVA, M.C.; GOTTFRIED, C.; SILVA, F.R.M.B.; PESSOA-PUREUR, R. Thyroid Hormones Reorganize the Cytoskeleton of Glial Cells Through Gfap Phosphorylation. **Mol Cell Endocrinol.** v.27(7), p. 845-865, 2007b.

ZAMONER, A.; BARRETO, K.P.; FILHO, D.W.; SELL, F.; WOHL, V.M.; GUMA, F.C.; SILVA, F.R.; PESSOA-PUREUR, R. Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 267, p. 116-26, 2007c.

ZAMONER, A.; HEIMFARTH, L.; PESSOA-PUREUR, R. Congenital hypothyroidism is associated with intermediate filament misregulation, glutamate transporters down-regulation and MAPK activation in developing rat brain. **NeuroToxicology**. v.29, p. 1092–1099, 2008a.

ZAMONER, A.; HEIMFARTH, L.; LOUREIRO, S.O.; ROYER, C.; SILVA, F.R.M.B.; PESSOA-PUREUR, R. Nongenomic Actions Of Thyroxine Modulate Intermediate Filament Phosphorylation In Cerebral Cortex Of Rats. **Neuroscience**. v.156, p.640–652, 2008b.

ZAMONER, A.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Membrane-initiated actions of thyroid hormones on the male reproductive system. **Life Sci.** v.89, p.507–514, 2011.

ZAMONER, A.; PESSOA-PUREUR, R. Nongenomic Actions Of Thyroid Hormones: Every Why Has A Wherefore. **Immun., Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem.**, v.11, p. 2011

ZANATTA, AP.; ZANATTA, L.; GONÇALVES, R.; ZAMONER, A.; SILVA, F.R.M.B. Integrin participates in the effect of thyroxine on plasma membrane in immature rat testis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1830, p.2629–2637, 2013.

ZHANG, H.; DICKINSON, D. A.; LIU, R.-M.; FORMAN, H. J. 4-Hydroxynonenal increases g-glutamyl transpeptidase gene expression through mitogen-activated protein kinase pathways. **Free Radic. Biol. Med**, v. 38, p. 463-471, 2005.

ZHANG, H.; FORMAN, H. J. Redox Regulation of γ -Glutamyl Transpeptidase. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 41, 2009.

ZHU, X.G., HANOVER, J.A., HAGER, G.L., CHENG, S.Y. Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. **J Biol Chem**, v. 273, p. 27058-27063, 1998.

ZOELLER, R.T.; ROVET, J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. **Neuroendocrinology**, v. 16, p. 809-18, 2004.